

Hemmung oder Überexpression der Tyrosinkinase Trk in hämatologischen Zelllinien und ihre Effekte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christiane Heineck

aus Mainz

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik IV und Poliklinik,
SP. Hämatologie/ Onkologie/ Hämostaseologie
Direktor: Prof. Dr. med. H. Pralle
des Universitätsklinikums Gießen

1. Gutachter: PD Dr. Kabisch

2. Gutachter: Prof. Dr. Bux

Tag der Disputation: 22.02.2002

Meinem Urgroßvater



Promotionsfeier in Gießen 1902

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Genetische Grundlagen, Onkogene und Proto-Onkogene | 1 |
| 1.2 | Tyrosinkinasen | 2 |
| 1.2.1 | Einteilung und Aufbau | 2 |
| 1.2.2 | Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen | 3 |
| 1.2.2.1 | Folgen der Signalaktivierung | 5 |
| 1.2.2.2 | Antionkogene und ihre Wirkung | 5 |
| 1.3 | Die Tyrosinkinase Trk als Proto-Onkogenprodukt und Neurotrophinrezeptor | 6 |
| 1.4 | Antisense-Oligonukleotide | 9 |
| | | |
| 2 | Ziel der Arbeit | 13 |
| | | |
| 3 | Material und Geräte | 14 |
| 3.1 | Hilfsmittel | 14 |
| 3.2 | Chemikalien | 15 |
| 3.3 | Verwendete Zelllinien | 18 |
| 3.4 | Oligonukleotide für Antisense-Versuche | 18 |
| 3.5 | PCR-Primersequenzen | 18 |
| 3.6 | Antikörper | 19 |
| 3.7 | Lösungen | 20 |
| 3.7.1 | Agarosegelelektrophorese | 20 |
| 3.7.2 | Kinase-Assay | 20 |
| 3.7.3 | Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) | 21 |
| 3.7.4 | Western-Blotting | 22 |
| | | |
| 4 | Methoden | 23 |
| 4.1 | Zellkulturen | 23 |
| 4.1.1 | Propagierung und Selektion des c-trk-Plasmids pDM69 in E.coli | 23 |
| 4.1.2 | Isolierung der erzeugten Plasmid DNA | 24 |
| 4.1.3 | Transfektion von 32D Zellen mit c-trk pDM69 | 24 |
| 4.2 | Nukleinsäuren | 24 |
| 4.2.1 | Qualitätskontrolle der RNA, DNA und Amplifikationsprodukte | 24 |
| 4.2.2 | RNA-Isolierung | 25 |
| 4.2.3 | Reverse Transkription | 25 |
| 4.2.4 | β-Actin-RT-PCR | 25 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.5 | trk-RT-PCR | 26 |
| 4.3 | Elektrophoresen | 27 |
| 4.3.1 | Agarosegelelektrophorese | 27 |
| 4.3.2 | Polyacrylamidgelelektrophorese | 27 |
| 4.3.3 | Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) | 27 |
| 4.4 | Kinase-Assay | 28 |
| 4.5 | Western-Blotting und Chemilumineszenznachweis | 28 |
| 4.6 | Photometrische Protein- und RNA-Mengenbestimmung | 29 |
| 4.7 | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test) | 30 |
| 4.8 | Zytopräparatherstellung | 30 |
| 4.9 | AB-Serum-Gewinnung | 30 |
| 5 | Ergebnisse | 31 |
| 5.1 | β -Actin- und trk-RT-PCR mit RNA aus K562 und HEL | 31 |
| 5.2 | β -Actin und trk-RT-PCR mit RNA von AML-Patienten | 32 |
| 5.3 | Untersuchung der Expression von p140 ^{Trk} in den Zelllinien K562, CML-T1, U937 und HEL | 34 |
| 5.4 | Wirkung von Oligonukleotiden auf die Expression von Trk | 35 |
| 5.5 | Wirkung von Oligonukleotiden auf das Zellkulturwachstum | 41 |
| 5.6 | Zellmorphologie | 42 |
| 5.7 | Expression und Phosphorylierung von Erk und Akt | 42 |
| 5.7.1 | Erk-Expression und Phosphorylierung bei D32-trk und K562-trk nach NGF-Inkubation | 42 |
| 5.7.2 | Akt-Expression und Phosphorylierung bei D32-trk nach NGF-Inkubation | 44 |
| 5.7.3 | Inhibition der Phosphorylierung von Akt und Erk durch K252a | 46 |
| 5.7.4 | Inhibition von Erk durch PD098059 | 47 |
| 5.8 | Phosphorylierung von Trk und Fos bei D32-trk nach NGF-Inkubation | 48 |
| 5.9 | DNA-Bindung von AP-1 nach NGF-Inkubation | 50 |
| 5.10 | Die Wirkung von NGF auf das Zellkulturwachstum von D32-trk und D32-wt | 51 |
| 5.11 | Wirkung von NGF und K252a auf das Zellkulturwachstum von D32-trk und D32-wt | 53 |
| 5.12 | MTT-Test zur Beurteilung der Wirkung von NGF auf D32-trk und D32-wt | 54 |
| 5.13 | p27 ^{Kip} , p21 ^{Cip/Waf} und Rb bei D32-trk und D32-wt nach NGF-Inkubation | 56 |
| 5.14 | Phosphorylierung von Rb bei D32-trk nach NGF-Inkubation | 58 |

| | | |
|----------|---------------------------------------|-----------|
| 6 | Diskussion | 60 |
| 6.1 | Einfluß von Trk auf Erk und Akt | 61 |
| 6.2 | Wirkung von Kinaseinhibitoren | 62 |
| 6.3 | Einfluß von NGF auf die Proliferation | 63 |
| | | |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 65 |
| | | |
| 8 | Literaturverzeichnis | 67 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BDNF | <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> |
| CDI | <i>Cycline Dependent Kinase Inhibitor</i> |
| CDK | <i>Cycline Dependent Kinase</i> |
| c-DNA | <i>copy-DNA</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) |
| CTP | Cytidin-5'-triphosphat |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| DG | Diacylglycerol |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| EDTA | Äthylendiamintetraacetat |
| ERK | Extrazellulär regulierte Kinase |
| FCS | fötales Kälberserum |
| GAP | GTPase aktivierendes Protein |
| Grb2 | Adaptorprotein (<i>Growth Factor Receptor Binding Protein 2</i>) |
| GSK3 | Glycogen-Synthase-Kinase 3 |
| IL-3 | Interleukin 3 |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trisphosphat |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| MAP | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| m-RNA | messenger RNA |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> (Nervenwachstumsfaktor) |
| NT-3 | Neurotrophin-3 |
| NT-4/5 | Neurotrophin-4/5 |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat |
| PKB | Proteinkinase B |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC-γ | Phospholipase C-γ |
| Pyk2 | <i>Proline-Rich Tyrosinkinase 2</i> |
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |

| | |
|-------|---|
| SH | <i>Src Homology</i> |
| SHC | Adaptorprotein (<i>Src Homology and Collagen</i>) |
| SOS | Adaptorprotein (<i>Son Of Sevenless</i>) |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Trk | <i>Tropomyosin Receptor Kinase</i> |

Nach der Konvention werden Namen von Onkogene beziehungsweise Proto-Onkogenen klein geschrieben, die Genprodukte (Proteine) werden mit Großbuchstaben bezeichnet.

1 Einleitung

1.1 Genetische Grundlagen, Onkogene und Proto-Onkogene

Nach dem heutigen Wissensstand hat eine Krebserkrankung ihren Ursprung in Veränderungen der Erbsubstanz der betroffenen Zellpopulation eines Individuums. Die Ursache einer Tumorerkrankung ist meist die erworbene genetische Läsion. Dabei werden Gene betroffen, deren Produkte Elemente der wichtigen physiologischen Zellfunktionen, wie Signalerkennung, Signaltransduktion und Regulation von Proliferation und Differenzierung sind. Identifiziert wurden zahlreiche dieser Gene zunächst als Bestandteile des Genoms krebserzeugender (=onkogener) Retroviren. Peyton Rous, wies erstmalig 1910 nach, dass bei gesunden Hühnern, durch Übertragung von zellfreien Extrakten aus Sarkomen von erkrankten Hühnern neue Tumoren erzeugt werden konnten [94, 95, 96]. Aus diesen Extrakten konnte zunächst das Rous-Sarkom-Virus isoliert werden. Bei der genaueren Analyse dessen Genoms und denen anderer Tumorstämme zeigte sich, dass meist ein bestimmtes Gen für die Fähigkeit, gesunde Zellen zu transformieren entscheidend war. Diese Gene bezeichnete man als Onkogene. Ihre Mechanismen im neoplastischen Transformationsprozess wurde durch die Entdeckung von Stehelin, Varmus, Bishop et al. vermutet. Die Gruppe beobachtete, dass Onkogene nicht virusspezifisch sind, sondern in ähnlicher Form als sogenannte Proto-Onkogene schon zur Ausstattung gesunder Zellen gehörten [109, 118]. In einigen menschlichen Tumoren fanden sich Proto-Onkogene zu Onkogenen mutiert [11]. Durch die Transfektion von NIH3T3-Zellen, einer Zelllinie von Mäusefibroblasten mit DNA aus menschlichen Tumorzellen konnte nachgewiesen werden, dass mutierte Proto-Onkogene, die mit Hilfe der Retroviren entdeckt wurden, Tumorstamm auslösten [118, 6].

Bisher wurden mehr als 50 Proto-Onkogene identifiziert, welche in unterschiedlich mutierten Formen bei Neoplasien eine Rolle spielten [102]. Die von den Proto-Onkogenen kodierten Produkte gehörten in ihrer Funktion den Proteinen der Signalübertragung an. Einige waren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und in der Zellmembran lokalisiert (z.B. c-Fms, HER2-Neu u.a. [29, 107, 3]). Eine kleine aber bedeutungsvolle Gruppe von Proto-Onkogenen kodierte für Wachstumsfaktoren (z.B. sis [52]), eine weitere für Proteine, die an DNA binden und eine enge biologische Korrelation mit dem Zellzyklus aufwiesen (z.B. myc-Familie, c-fos, c-jun, u.a. [16, 98]); sie waren im Zellkern lokalisiert. Eine Gruppe wurde von Genen repräsentiert, die GTP-bindende Proteine kodierten (z.B. ras-Familie [23]); sie waren an der Zellmembran lokalisiert. Und zuletzt gab es eine große Zahl von vernetzten Proteinkinasen und -phosphatasen im Zytoplasma. Alle diese Moleküle dienten normalerweise komplizierten Übertragungsketten zur Weiterleitung von Signalen für die Proliferation und Differenzierung. Durch Mutationen waren sie so verändert, dass sie durch eine Signalfehlsteuerung zu undifferenziertem Wachstum führten. Es gab mehrere Grundtypen von veränderten Proto-Onkogenen. Sie konnten durch eine Punktmutation

verändert sein, wie zum Beispiel bei der GTP-bindenden Proteinfamilie ras, welche in multiplen Neoplasien auftrat [81, 23, 43]. Weiterhin konnte durch eine Chromosomentranslokation ein Fusionsgen stärker transkribiert werden und das Fusionsprotein im Übermaß erzeugt werden. Ein Beispiel hierfür bot die Translokation t(8;14) beim follikulären Non-Hodgkin-Lymphom [128] oder die Translokation t(9;22) (Philadelphia-Chromosom) mit dem Fusionsgen bcr/c-abl bei der chronischen myeloischen Leukämie [84].

In mehreren Tumoren waren chromosomale Verluste festgestellt worden, die mit dem Tumorwachstum verbunden schienen. Offenbar waren es Anti-Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene, deren Produkte ein Gegengewicht zu den proliferationsaktivierenden Proto-Onkogenen darstellten. Sie inhibierten die Proliferation und ihr Verlust oder Funktionsverlust durch Mutation trugen zur Tumorgenese oder -progression bei [65]. Hierzu zählten zum Beispiel das Retinoblastom-Gen Rb [122] und das Tumorsuppressor-Gen p53 [64].

Die Kenntnisse von Onkogenen und Tumorsuppressorgen trugen entscheidend zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression bei. Sie veranlassten die Suche nach Möglichkeiten die Tumorentstehung auf genetischer Basis zu unterlaufen. Im Rahmen einer somatischen Gen-therapie sollte z.B. die Expression dominanter Onkogene durch „Antisense“- Konstrukte blockiert werden oder durch medikamentöse Behandlung gezielt die pathologischen Signalketten unterbunden werden. Die Defekte mutierter Tumor-suppressorgene sollte durch Einbringen der natürlichen Wildtypgene korrigiert werden.

1.2 Tyrosinkinasen

1.2.1 Einteilung und Aufbau

Heute wissen wir, dass fast ein Drittel aller bekannten Onkogene als funktionellen Bestandteil eine für Tyrosinreste spezifische Kinasedomäne aufweisen [46]. Diese grosse Enzymfamilie der Tyrosinkinasen wird in zwei funktionelle Gruppen unterteilt, die Rezeptortyrosinkinasen und die Nicht-Rezeptortyrosinkinasen. Die Nicht-Rezeptorproteinkinasen werden in Kinasen der sogenannten Src-Familie, die Fes/Fps-Kinasen, die Abl-Kinasen und die Jak-Kinasen eingeteilt [47].

Rezeptortyrosinkinasen besitzen im Gegensatz hierzu transmembranöse Domänen und zeigen spezifische topologische Merkmale: auf der Zelloberfläche die glykosilierte Ligandenbindungsdomäne für Wachstumsfaktoren oder Hormone, eine kurze hydrophobe transmembranäre Domäne und eine intrazellulär wirksame Proteintyrosinkinasedomäne.

Die Rezeptortyrosinkinasen werden nach ihrer Molekülstruktur in neun verschiedene Gruppen eingeteilt [117]. Nach dieser Einteilung gehört das humane Trk Proto-Onkogenprodukt zu der Gruppe VII (Abbildung 1).

Humanes Trk-Proto-Onkogenprodukt

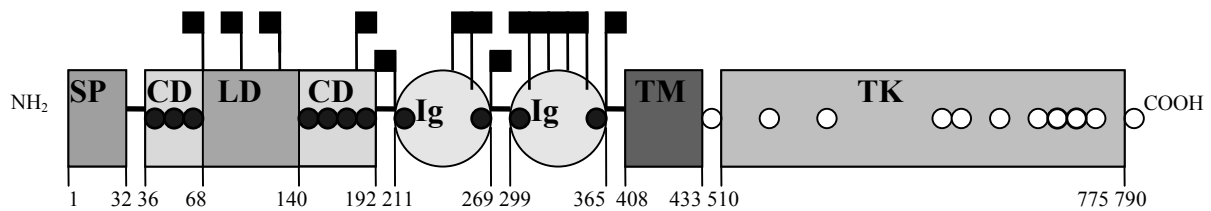


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Trk/gp140^{trk} Tyrosinkinase-Rezeptors mit verschiedenen strukturellen Domänen modifiziert nach Barbacid [6]

SP - Signalpeptid; CD - Cystein Domäne; LD - Leucin Domäne; Ig - Immunglobulin ähnliche Domäne; TM - Transmembranöse Domäne; TK - Tyrosinkinasedomäne; kleine dunkle Kreise - Cysteinreste in der extrazellulären Domäne; kleine helle Kreise - Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne; kleine dunkle Quadrate - mögliche N-Glykosilierungsstellen.

1.2.2 Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen

Die Weiterleitung der von Wachstumsfaktoren induzierten Signale von der Zelloberfläche bis zum Zellkern wird als Signaltransduktion bezeichnet. Sie beginnt mit der Ligandenbindung an den Rezeptor einer Tyrosinkinase und nachfolgender Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch phosphorylieren sich die Rezeptoren gegenseitig an den zytoplasmatischen Domänen an mehreren Tyrosinresten (= Autophosphorylierung) [50]. Der Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*) induziert z. B. die Phosphorylierung von Trk in PC12 Zellen an fünf Tyrosinresten: Y490, Y785, Y670, Y674 und Y675 [111]. Die autophosphorylierten Tyrosinreste dienen später als hochaffine Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine. Hierzu gehören unter anderen GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die Phospholipase C- γ (PLC- γ), das Bindungsprotein Shc und die Src-ähnlichen Nicht-Rezeptorproteintyrosinkinasen [85]. Jedes dieser Proteine bindet an einen anderen phosphorylierten Tyrosinrest des aktivierten Rezeptors entsprechend der unmittelbaren Umgebung des phosphorylierten Tyrosinrests. Zudem werden sie zum Grossteil selbst an Tyrosinresten phosphoryliert. Trotz unterschiedlicher Struktur und Funktion dieser intrazellulären Signalproteine sind ihnen zwei hochkonservierte, nicht-katalytische Domänen, die man als SH2 und SH3 bezeichnet (= Src-Homologie-Region 2 und 3, da ursprünglich im Src-Protein gefunden) gemeinsam. Die SH2-Domänen erkennen spezifische phosphorylierte Tyrosinreste im Kontext mit anderen Aminosäuren und ermöglichen den Signalproteinen sowohl eine Bindung

an aktivierte Rezeptortyrosinkinasen als auch an andere intrazelluläre Signalproteine, die vorübergehend an Tyrosinresten phosphoryliert wurden. Die SH3-Domänen können die Proteine binden, die in der Signalkaskade nachfolgend wirken [100]. Insgesamt handelt es sich bei der intrazellulären Signalübertragung immer um ein weit verzweigtes und reguliertes Netz. Der Grad der Aktivierung und der benutzte Signaltransduktionsweg sind abhängig von der Anzahl und der Zusammensetzung der aktivierten Zellrezeptoren. PLC- γ katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) in den Second Messenger Diacylglycerol (DG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) [93]. DG wiederum aktiviert die Proteinkinase C, während IP₃ den intrazellulären Calciumspiegel erhöht und über die *Proline-rich tyrosinkinase* (Pyk2) die Aktivierung von Shc unterstützt. Aktiviertes Shc bindet an ein kleines Adapterprotein Grb2 welches über SOS zu einer Bindung an die GTPase Ras führt [112]. Aktivierung von Ras führt zu einer Weiterleitung der Signale über eine mehrfach ineinandergreifende Kaskade von Serin- und Threonin-Phosphorylierungen, die langlebiger sind als die ursprünglichen Tyrosinphosphorylierungen. Eine wichtige Rolle in dieser Kaskadenreaktion nehmen die mitogenaktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), auch als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet, ein. MAP-Kinasen müssen, um ihre volle Aktivität zu erlangen an einem Threonin- und an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden. Die Proteinkinase, die beide Phosphorylierungen katalysiert, ist die MAP-Kinase-Kinase. Die MAP-Kinase-Kinase wird selbst über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten aktiviert, die durch die MAP-Kinase-Kinase-Kinase katalysiert wird, welche wiederum durch aktiviertes Ras stimuliert wird. Bei der MAP-Kinase-Kinase-Kinase handelt es sich häufig um die Serin- und Threoninkinase Raf [119]. Sowohl Raf als auch die ERKs sind wiederum in der Lage durch Aktivierung der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (=cycline dependent kinase CDK) Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus zu nehmen [13, 36]. Einmal aktiviert wandert die MAP-Kinase aus dem Zytosol in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie z. B. Elk-1, Jun oder Myc. Elk-1 wiederum schaltet die Transkription des fos-Gens an. Das phosphorylierte Jun-Protein bildet mit dem Fos-Protein ein aktives genregulatorisches Protein, das AP-1 [55]. Die Signaltransduktion kann auch über einen anderen Weg durch ein weiteres Protein erfolgen, das mittels SH2-Domänen an spezifische Phosphotyrosinreste aktivierter Rezeptorkinasen bindet und sich hiermit in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran befindet. Das Enzym ist die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Seine unmittelbare Wirkung ist die Phosphorylierung des Inositolrings an Position 3 von Phosphatidylinositol, das wiederum ein Bestandteil der Plasmamembran ist [124]. Die mehrfach phosphorylierten Phospholipide binden und aktivieren das Signalprotein Akt, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet [35]. Akt wiederum führt zur Phosphorylierung von BAD und Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3). BAD verhindert in phosphorylierter Form den Zelltod, es wirkt damit antiapoptotisch und unterstützt somit die Zellproliferation [27]. GSK3 wird durch Serinphosphorylierung inaktiviert und hat Einfluss auf den Abbau von β -Catenin, welches wiederum durch seine Bedeutung bei der

Regulation des Zytoskeletts, als auch bei der Gentranskription zu malignem Wachstum führen kann.[90].

1.2.2.1 Folgen der Signalaktivierung

Die Gene, die durch die Signalkaskade der Wachstumsfaktoren induziert werden können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Gene für eine frühe Antwort werden innerhalb von Minuten nach der Behandlung mit Wachstumsfaktoren transkribiert, hierzu gehören zum Beispiel *jun*- und *fos*-Proto-Onkogene. Sie können gegebenenfalls direkt zum Eintritt der Zelle in den Zellzyklus führen [88]. Gene für eine verzögerte Antwort werden unter anderem durch die Produkte der Gene der frühen Antwort induziert. Sie werden nicht vor Ablauf von mindestens einer Stunde nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren transkribiert. Zu ihren Produkten zählen unter anderem wichtige Faktoren zur Kontrolle des Ablaufs des Zellzyklus.

1.2.2.2 Antionkogene und ihre Wirkung

Das Kontrollsystem des Zellzyklus beruht auf zwei Familien von Schlüsselproteinen. Die Erste ist die Familie der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (= *cycline dependent kinase* CDK), von denen bisher sieben Kinasen von CDK1 (= Cdc2) bis zu CDK7 bekannt sind, die nachgeordnete Prozesse durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine an Serin- und Threoninresten auslösen [41]. Die Zweite ist eine Familie spezialisierter Aktivierungsproteine, sogenannter Cycline, die an CDK-Moleküle binden und die Fähigkeit, entsprechende Zielproteine zu phosphorylieren, kontrollieren. Hiervon wurden bisher wenigstens sieben unterschiedliche Moleküle gefunden, die als Cyclin A, B, C, D, E, F und G bezeichnet werden.

Periodisches Zusammenlagern, Aktivieren und das Auseinanderweichen von Cyclin-CDK-Komplexen sind zentrale Ereignisse im Zellzyklus. Neben den CDKs existieren auch CDK inhibierende Proteine (= *cycline dependent kinase inhibitors*=CDIs), zu denen unter anderen $p27^{Kip}$ und $p21^{Cip/Waf}$ gehören. Diese können CDK/Cyclin-Komplexe durch Anlagerung inhibieren und somit den Ablauf des Zellzyklus verzögern [104].

Weitere inhibitorische Proteinen sind die Produkte von Tumorsuppressorgenen. Hiervon ist das zuerst untersuchte Retinoblastom-Gen (Rb-Gen) primär aus Retinoblastomen isoliert worden. Wachstumsfaktoren verhindern die von Rb ausgeübte Hemmung, indem sie die Phosphorylierung des Proteins an mehreren Serin- und Threoninresten verursachen. Hierdurch wird die Hemmung der Transkription einiger Gene wie *fos* und *myc* durch Rb aufgehoben, da diese nur im nichtphosphorylierten Zustand von Rb wirksam wird [44]. Eine schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges wird in Abbildung 2 gezeigt.

1.3 Die Tyrosinkinase Trk als Proto-Onkogenprodukt und Neurotrophinrezeptor

Aus Zellkernen einer Biopsie eines Kolonkarzinoms hat Pulciani 1982 [91] ein neues Onkogen isoliert, welches aus einer Fusion eines Tropomyosins mit der Kinasedomäne einer bis dahin unbekannten Tyrosinkinase entsteht [75]. Man nennt es daher kurz *trk* für *tropomyosin receptor kinase*. Bei der genauen Analyse der Tyrosinkinase hat man das physiologische *trk*-Proto-Onkogen gefunden, dessen extrazelluläre Domäne ein Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (NGF, *nerve growth factor*) ist [63]. Das *trk*-Proto-Onkogen ist beim Menschen in der Region q32 bis q41 des Chromosoms 1 lokalisiert [77].

NGF gehört zusammen mit BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4 auch NT-5 genannt zur Familie der Neurotrophine. Sie spielen bei der Embryonalentwicklung und der Regulation von postembryonalen Differenzierungs- und Reparaturmechanismen des ZNS eine entscheidende Rolle [66]. Neben der Bedeutung von NGF und anderer Neurotrophine in der physiologischen Nervenzellentwicklung kann sowohl die Wirkung ihrer Rezeptoren als Onkogen [69], als auch ihre tumorwachstumshemmende Wirkung [79, 101] nachgewiesen werden. Die Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten mit *trk* führte zu einem deutlichen Anstieg der Proliferationsrate [25]. Andererseits korreliert in der Klinik eine hohe Expression von *Trk* in Neuroblastomazellen mit einer verbesserten Überlebensprognose [61]. NGF bindet nicht nur an den sogenannten „high affinity“ Rezeptor gp140^{Trk} sondern auch an einen „low affinity“ Rezeptor p75^{NGFR} [51].

Durch Hybridisierung mit der bekannten Gensequenz des *c-trk* Proto-Onkogens (auch *trkA*), hat man weitere Mitglieder der *trk*-Familie entdeckt: *trkB* und *trkC*. Diese zeigen grosse Homologien zu *trkA* (siehe Abbildung 3).

TrkA ist der bevorzugte Rezeptor für NGF, bindet jedoch auch mit einer geringeren Affinität NT-3 oder NT-4/5. *TrkB* bindet BDNF und NT-4 und mit einer geringeren Affinität NT-3 [58]. *TrkC* bindet als einzigen Liganden NT-3 [62], während der „low affinity Rezeptor“ p75^{NGFR} alle bekannten Neurotrophine bindet [72, 18]. Die Liganden-Rezeptor-Verbindungen von *TrkA*, *TrkB* und *TrkC* sind in Abbildung 3 schematisch wiedergegeben.

Signaltransduktionskaskade

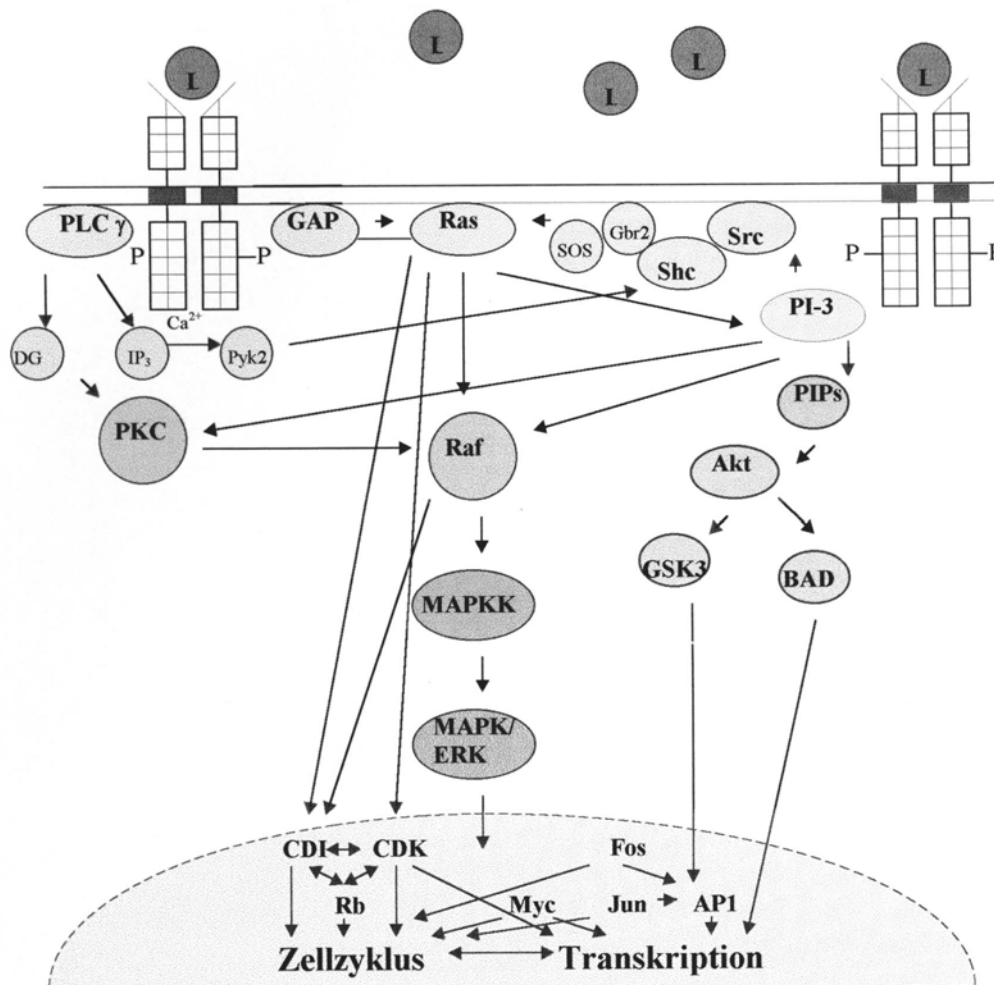


Abbildung 2

Schema der intrazellulären Signaltransduktionskaskade nach Ligandenbindung an Rezeptorkinasen modifiziert nach Campbell [15]

CDI - *Cycline dependent kinase inhibitor*, CDK - *Cycline dependent kinase*, DG - Diacylglycerol, ERK - Extrazellulär regulierte Kinasen = MAPK - Mitogenaktivierte Protein-Kinase, GAP - GTPase aktivierendes Protein, GSK3 - Glycogen-Synthase-Kinase 3, IP₃ - Inositoltriphosphat, L - Ligand, MAPKK - Mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase, PI-3 - Phosphatidylinositoltriphosphat-Kinase, PIPs - Phosphatidylinositolphosphate, PKC - Proteinkinase C, PLC γ - Phospholipase C γ, Rb - Retinoblastomprotein, karierte Dimere - Rezeptorkinasen.

Neurotrophinrezeptoren

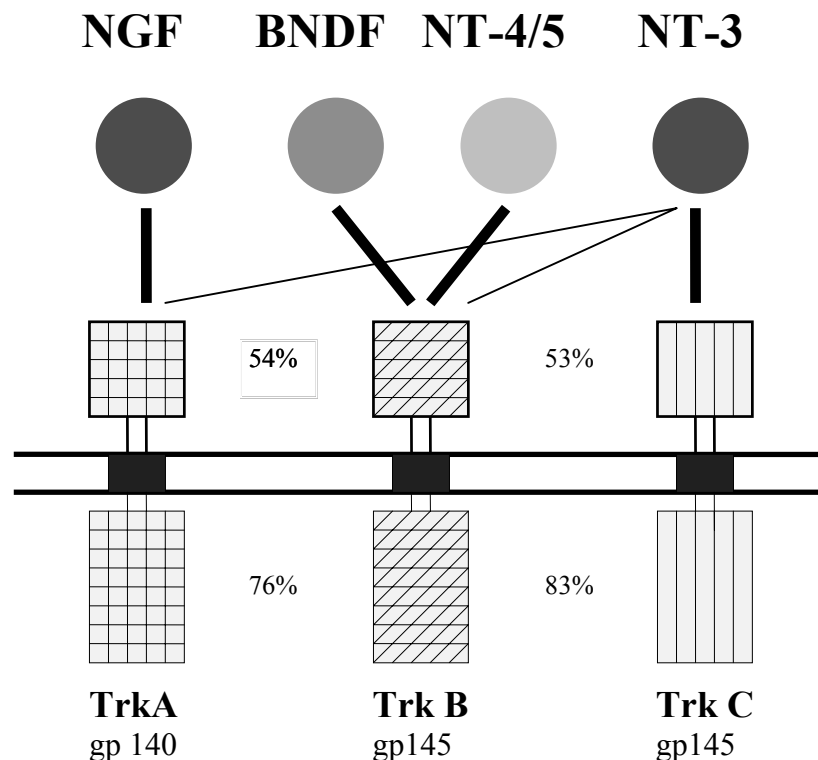


Abbildung 3

Schematische Darstellung der Ligand-Rezeptor-Beziehung zwischen den Neurotrophinen und der Trk-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren modifiziert nach Barbacid [6]

Primäre Ligand-Rezeptor-Verbindungen werden durch dicke Pfeile markiert. Sekundäre Beziehungen, wie sie in speziellen Zellkultursystemen entdeckt wurden, werden durch dünne Pfeile markiert. Die Prozentzahlen zwischen den einzelnen Rezeptortypen geben den Grad der Homologie wieder.

Neben seinen vielfältigen Funktionen im ZNS sind für NGF auch Wirkungen im hämatologischen System beschrieben worden. Unter anderem hat man bei Ratten durch NGF eine Degranulation von peritonealen Mastzellen induziert [89]. Weiterhin beobachtet man unter NGF Veränderungen der Form von Thrombozyten [38], eine beschleunigte Wundheilung [5], eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten [14] und eine lebensverlängernde Wirkung auf eosinophile Granulozyten [39]. Durch die funktionelle Identifizierung des Trk-Genproduktes haben ältere Berichte über den Einfluss von NGF auf hämatopoetische und lymphatische Zellen einen neuen Aspekt bekommen [14]. Die genaue Kenntnis der Wirkung von Trk als Rezeptor von NGF mit möglicher

Beeinflussung des Wachstums- bzw. Differenzierungsverhaltens der Zellen könnte das Wissen über den Entstehungsmechanismus von Neoplasien erweitern.

1993 hat Erhard et al. [33] Trk-Expression bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen und allgemein bei aktivierten T-Zellen nachgewiesen. 1994 konnte Chevalier et al. trk RNA in hämatopoetischen Vorläuferzellen sichtbar machen [20]. Hiermit ist im hämatologischen System die Wirkung von NGF über Trk als Rezeptor wahrscheinlich geworden.

Kabisch et al. hat die Expression von Trk in mehreren myeloischen Zelllinien unter verschiedenen differenzierungsinduzierenden Substanzen untersucht und unterschiedliche Expressionsmuster gefunden [53]. Die mRNA von trk war mittels RT-PCR bei den Zelllinien HEL, K562 und erstmalig bei HL-60 und KG-1 nachzuweisen. Das Protein gp140^{Trk} war mittels Western-Blotting bei den Zelllinien HEL, K562 und HL-60 nachgewiesen worden. Bei den Zelllinien U937 und THP-1 war weder die trk mRNA noch das Genprodukt nachweisbar. Bei Zugabe von NGF zu den trk exprimierenden Zelllinien kam es zu einer vermehrten Autophosphorylierung von gp140^{Trk}, nachgewiesen durch einen phosphotyrosinspezifischen Antikörper. Jedoch zeigte sich keine spezifische wachstumsstimulierende oder wachstumshemmende Wirkung in den untersuchten Zelllinien [53]. Weiterhin wurde trk mRNA bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nachgewiesen. Eine Aussage über trk-Expression als Prognosefaktor war aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich [53]. Somit blieb der spezielle Effekt der trk-Expression und einer Ligandenstimulation von Trk im hämatopoetischen System weiterhin unklar.

1.4 Antisense-Oligonukleotide

Veränderungen der Zellen in ihrem Wachstums und Differenzierungsverhalten können nach spezifischer Hemmung der Translation und Transkription einzelner Onkogene und Tumorsuppressorgene beobachtet und interpretiert werden, um weitere Erkenntnisse bezüglich der genauen Funktion und Wirkungsweise dieser Gene zu erzielen.

Eine spezielle Methode hierfür bieten Antisense-Oligonukleotide: zu einer definierten Zielsequenz wird ein komplementärer DNA- oder RNA-Oligonukleotid einzelstrang synthetisiert. Durch Hybridisierung mit der Zielsequenz kann sowohl auf der Stufe der DNA die Transkription als auch auf RNA-Ebene die Translation bei der ribosomalen Proteinsynthese behindert werden.

Verschiedene Methoden nehmen auf die Genexpression und dessen Produkt unterschiedlich Einfluss: Kurze Doppelstrang DNA-Oligonukleotide oder Analoga werden benutzt um Transkriptionsfaktoren zu binden und so mit der genomischen DNA um diese spezifischen Transkriptionsfaktoren zu konkurrieren [10]. Antisense-Oligonukleotide können synthetisiert werden, die durch Anlagerung an die DNA-Doppelhelix unter Tripelhelix-Bindung zu einer

Transkriptionshemmung bestimmter Gene führen oder sich an während der Transkription kurzfristig auftretende Einzelstrangregionen der DNA binden [123, 24]. Oligonukleotide mit einer speziellen Substitution der Thyminbasen können ein DNA-Fragment aus der natürlichen Verbindung im Genom verdrängen [82]. Die Hybridisierung der Antisense-Oligonukleotide mit dem komplementären mRNA-Strang führt zu einem beschleunigten physiologischen Abbau des Doppelstrangs überwiegend durch RNaseH [21, 76]. Weiterhin verhindern gegen Splicing-Regionen gerichtete Oligonukleotide die Bildung von mRNA aus prä-mRNA [59].

Zamecnik und Stephenson benutzten 1978 zum ersten Mal erfolgreich Antisense-Oligonukleotide [127]. Sie konnten durch ein 13 basenpaarelanges Oligonukleotid, dass komplementär zu einer Sequenz des Rous-Sarkom-Virus war, die Virus-replikation in infizierten Hühnerembryofibroblasten erfolgreich hemmen. Nachfolgend konnte für weitere Gene eine spezifische Inhibition durch Anti-sense-Oligonukleotide in Zellkultur [8, 17] und in Tierversuchen [26, 92] nachgewiesen werden. Im hämatologischen System wurden von Szczylik [113] und Skorski [106] eine spezifische Wachstumshemmung bei chronischer myeloischer Leukämie durch Antisense-Oligonukleotide in vitro gezeigt.

Die Wirksamkeit der Oligonukleotide ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen müssen sie eine erhöhte Resistenz gegen die im Serum vorkommenden Nukleasen besitzen. Um eine schnelle Degradierung der Oligonukleotide zu verhindern wird serumfreies Medium für die Inkubationsphase verwendet oder das fötale Kälberserum zur Nukleaseninhibition auf 65 °C erwärmt. Oligonukleotide mit Phosphodiesterverbindungen sind auch gegen intrazelluläre Nukleasen sensibel [1, 42]. Die Degradierung erfolgt dabei nahezu ausschließlich durch eine 3'-Exonuklease [32]. Um die Stabilität gegenüber Nukleasen zu erhöhen, wird eine Reihe von Modifikationen der Oligonukleotide vorgenommen. Die häufigsten Modifikationen betreffen die freien Enden der Phosphatgruppen im Phosphorsäurerückgrat (z.B. Phosphothioat- oder Methylphosphat-Oligonukleotide [15, 48, 74]). Ortigao et al. [86] führten eine 3' Phosphodiester-Bindung (statt einer 3'-5'-Bindung) am 3'-Ende des Oligonukleotids an, so dass die beiden Enden der Nukleinsäure von einem freien Kohlenstoffatom in

5'-Stellung begrenzt wurden. Hiermit konnten sie eine Resistenz gegen 3'-Exonukleasen und dadurch eine deutlich verlängerte Halbwertszeit erzielen.

Veränderungen von Strukturen haben aber einen negativen Einfluss auf die Hybridisierungseigenschaften. Weiterhin verlieren z.B. die Methylphosphate die Fähigkeit der RNaseH-Aktivierung, die möglicherweise wichtig ist [121].

Um wirksam zu werden, müssen die Oligonukleotide möglichst unverändert in die Zielzellen gelangen. Im Gegensatz zu den meisten therapeutischen antineoplastischen Substanzen, welche häufig ein niedriges Molekulargewicht besitzen und eher hydrophile Eigenschaften haben, sind die Oligonukleotide polyanionische Moleküle und damit für die passive Diffusion durch Zellmembranen ungeeignet. Oligonukleotide können im Zellkern nachgewiesen werden, wenn sie direkt in das Zytoplasma der Zellen injiziert werden. Andererseits führt eine

alleinige Inkubation der Zellen in oligonukleotidangereichertem Medium zu einer Akkumulation der Oligonukleotide im Zellplasma in Lysosomen oder Endo-somen, ohne dass sie in den Zellkern eindringen [120]. Versuche, welche die Reduktion der intrazellulären Aufnahme der Oligonukleotide nach Temperatur-erniedrigung oder durch Vorbehandlung der Zellen mit den Zellmetabolismus hemmenden Substanzen erreichen, deuten auf einen aktiven, energieabhängigen Mechanismus der Aufnahme hin [125]. Um die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen zu verstärken, wurden sie in kationische Liposomen "eingepackt" und so eine vermehrte Aufnahme nachgewiesen [21, 9]. Der genaue Transportmecha-nismus ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Spezifität der Oligonukleotide für spezielle Gensequenzen hängt von der Länge der Oligonukleotide ab. Jede menschliche Zelle hat ungefähr 3×10^9 Basenpaare in ihren Chromosomen, mit einem 16 nukleotidlangen Antisensestrang können bei vier verwendeten Basen $4^{16} = 4,2949 \times 10^9$ einmalige Versionen gebildet werden. Damit ist die theoretische Wahrscheinlichkeit einer Bindung an verschiedene Genabschnitte, spezifische Bindung vorausgesetzt, verschwindend gering. Unabhängig von der Länge der Oligonukleotide muss als Kontrolle ihrer spezifischen Wirkung entweder ein zum verwendeten Antisensestrang passender Sensestrang oder eine randomisierte, gleichlange Basenpaarsequenz gewählt werden, die eine anteilige Basenpaarzusammensetzung identisch zum Antisensestrang enthält.

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide mit Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom an der Phosphodiesterbindung (Phosphothioat-Oligonukleotide, siehe Abbildung 4) verwendet. Bei diesen Molekülen bleibt die Nettoladung und die Wasserlöslichkeit im Vergleich zu unveränderten Oligonukleotiden gleich, zusätzlich wird jedoch eine Chiralität eingeführt, die sie resistent gegen stereospezifische Nukleasen macht [108]. Als Kontrollsubstanz wurden gleichlange Senseoligonukleotide und randomisierte Kontroll-Oligonukleotide verwendet.

Modifikation der Antisense-Oligonukleotide

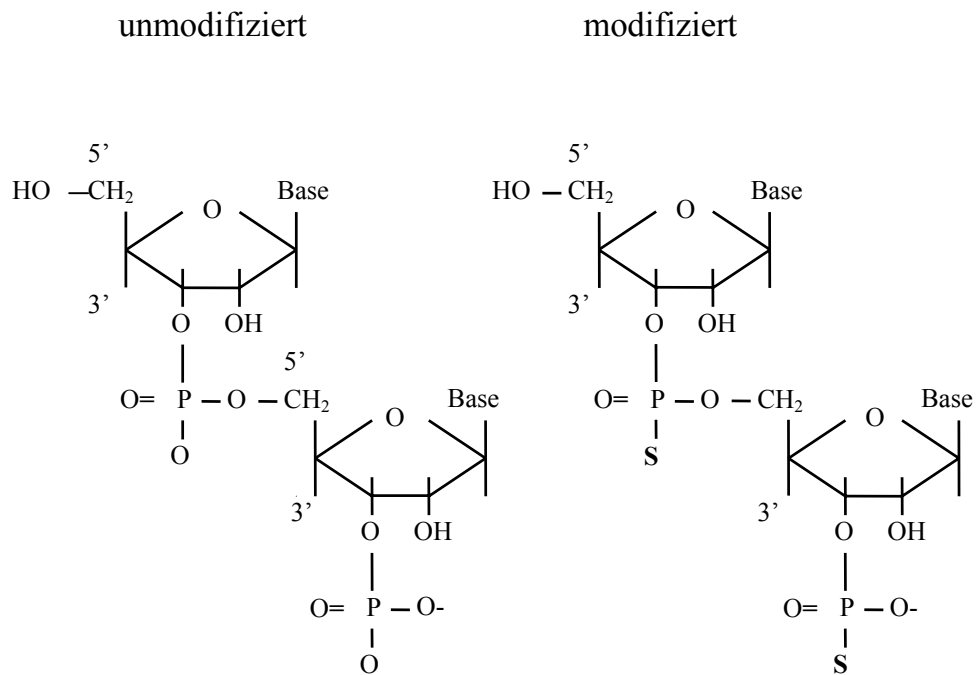


Abbildung 4

Darstellung der verwendeten Oligonukleotide

Molekulare Struktur unmodifizierter Oligonukleotide und der durch Austausch eines Sauerstoffatoms mit einem Schwefelatom modifizierten Phosphothioat-Oligonukleotide und ihre Internukleotidverbindungen.

2 Ziel der Arbeit

Die Rolle des Proto-Onkogens trk (Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors, NGF) für gesunde hämatologische und leukämische Zellen soll weiter geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wird durch modifizierte, gegen trk gerichtete Antisense-Oligonukleotide die Expression von trk auf RNA- und Proteinebene zu hemmen versucht. Zusätzlich wird die Wirkung von NGF auf trk-transfizierte myeloische Zelllinien zusammen mit den Proteinen der Signaltransduktionskaskade vom Rezeptor der Zellmembran bis zum Transkriptionsfaktor im Zellkern verfolgt, um zu einem verbesserten Verständnis der Steuerung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung zu kommen und damit in Zukunft neue, gezielte Therapiemöglichkeiten zu eröffnen.

3 Material und Geräte

3.1 Hilfsmittel

| | |
|---|---------------------------------------|
| Blottingkammer | KEUTZ, Reiskirchen |
| DNA Thermal Cycler | PERKIN ELMER, Norwalk, USA |
| Einmal-Filterhalter FP | SCHLEICHER UND SCHUELL, Dassel |
| Elektrophoresekammern | KEUTZ, Reiskirchen |
| Falcon ^R Blue Max TM (50ml, 15ml, steril) | BECTON |
| DICKINSON, Conical Tubes | Heidelberg |
| Falcon ^R Tissue Culture Flasks (250ml) | BECTON DICKINSON, Heidelberg |
| Lamin Air ^R HB 2448 | HERAEUS, Hanau |
| Microlane ^R 3 Kanülen | BECTON DICKINSON, Heidelberg |
| Microcomputer Electrophoresis Power Supply | KEUTZ, Reiskirchen |
| Mikroskop Labovet FS | LEITZ, Wetzlar |
| Multiwell Tissue Culture Plate 6, 24, 96 | BECTON DICKSON, Heidelberg |
| Zählkammer nach Neubauer | BRAND, Heidelberg |
| Nitrocellulosemembran Hybond ECL | AMERSHAM- BUCHLER, Braunschweig |
| Perfusorspritzen 50ml | BECTON DICKINSON, Heidelberg |
| Pipetten | EPPENDORF, Hamburg |
| Varipetten | ABIMED, Langenfeld |
| Pipetman | ELKAY, Galway, USA |
| Liquipette TM | GREINER, Solingen |
| 10ml, 20ml (steril) | BRAUN, Melsungen |
| Inject 2ml, 10ml | |
| Pipettenspitzen | EPPENDORF, Hamburg |
| Comfortips ^R gelb und blau | GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich |
| CP 10, 100 Tips | POLAROID, Delft, Niederlande |
| Tips for Pipetman 10µl | POLAROID, Delft, Niederlande |
| Polaroid Direct Screen Instant Camera | |
| Polaroid-Film Typ 667 (ASA 3000) | |

| | |
|---|-----------------------|
| Reaktionsgefäße | |
| Mikro Test Tubes 2ml | EPPENDORF, Hamburg |
| Thin walled reaction Tubes ^R | PERKIN ELMER |
| CETUS, | Norwalk, USA |
| 300µl Reaction Tubes | ELKAY PRODUCTS |
| | INC, Shrewsbury, USA |
| Röntgenfilmentwicklungskassette | AMERSHAM- |
| | BUCHLER, |
| | Braunschweig |
| UV-Transluminator | MAGV, Rabenau-Londorf |
| UV/VIS Spectrometer Lambda Bio | PERKIN ELMER, |
| | Norwalk, USA |
| Vakuumtrockengerät | KEUTZ, Reiskirchen |
| Zentrifugen | |
| Rotixa/KS | HETTICH, Tuttlingen |
| Eppendorf 5415 C | EPPENDORF, Hamburg |

3.2 Chemikalien

| | |
|--|-----------------------|
| Äthanol (70%) | MERCK, Darmstadt |
| Agarose | GIBCO BRL, Eggenstein |
| Ameisensäure | MERCK, Darmstadt |
| Ampicillin | SIGMA, Deisenhofen |
| AmpliTa ^R DNA Polymerase | PERKIN ELMER |
| CETUS, | |
| | Norwalk, USA |
| Anti-rabbit peroxidase labelled antibody | AMERSHAM- |
| | BUCHLER, |
| | Braunschweig |
| Anti-mouse peroxidase labelled antibody | AMERSHAM- |
| | BUCHLER, |
| | Braunschweig |
| Aqua destillata | BRAUN, Melsungen |
| ATP | BOEHRINGER, |
| | Mannheim |
| [³² P]-γATP | AMERSHAM- |
| | BUCHLER, |
| | Braunschweig |
| Bis-Tris-Propan | SIGMA, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | SIGMA, Deisenhofen |
| Coomassie (Brilliant Blue R 250) | SIGMA, Deisenhofen |
| dATP 100mM Gene Amp TM | PERKIN ELMER |
| CETUS, | Norwalk, USA |

dCTP 100mM Gene AmpTM
 CETUS,
 dGTP 100mM Gene AmpTM
 CETUS,
 dTTP 100mM Gene AmpTM
 CETUS,
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 EDTA (Titriplex)
 Essigsäure (100%)
 Ethidiumbromid
 FetalcloneTM

 First Strand Buffer
 (für Reverse Transkription)
 Fötales Kälberserum
 Gel Shift Assay System

 Glycin ROTIPURAN^R
 Glycerol
 G 418 Genitacin
 HCl
 High-Molecular-Weight-Standard
 Deisenhofen
 Humanes AB-Serum
 IL-3

 Isopropanol
 K252a
 KLENOW-FragELTM DNA Fragmentation
 Detection Kit

 LB-Agar
 Lipofectin^R

 2-Mercaptoäthanol
 Methanol

 Mineralöl
 M-MLV Reverse Transkriptase
 (Moloney-Murine Leukemia Virus RT)
 MnCl₂
 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]
 -2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
 NaF
 Na₂HPO₄

PERKIN ELMER
 Norwalk, USA
 PERKIN ELMER
 Norwalk, USA
 PERKIN ELMER
 Norwalk, USA
 SIGMA, Deisenhofen
 MERCK, Darmstadt
 MERCK, Darmstadt
 ROTH, Karlsruhe
 HYCLONE, United
 Kingdom
 GIBCO BRL, Eggenstein

 GIBCO BRL, Eggenstein
 PROMEGA, Madison,
 USA
 ROTH, Karlsruhe
 SIGMA, Deisenhofen
 GIBCO BRL, Eggenstein
 MERCK, Darmstadt
 SIGMA,

 BLUTBANK, JLU-Gießen
 R&D SYSTEMS,
 Wiesbaden
 MERCK, Darmstadt
 BIOMOL, Hamburg
 ONCOGENE
 RESEARCH
 PRODUCTS,
 Cambridge, USA
 SIGMA, Deisenhofen
 GIBCO BRL,
 Gaithersburg, USA
 SIGMA, Deisenhofen
 RIEDEL DE HAEN,
 Seelze
 SIGMA, Deisenhofen
 GIBCO BRL, Eggenstein

 SIGMA, Deisenhofen
 SIGMA, Deisenhofen

 SIGMA, Deisenhofen
 MERCK, Darmstadt

| | |
|--|--|
| NaH ₂ PO ₄ | MERCK, Darmstadt |
| NGF | BOEHRINGER, Mannheim |
| Nonidet-P 40 | SIGMA, Deisenhofen |
| Opti MEM Medium | GIBCO BRL, Eggenstein |
| PBS 10x (<i>Phosphat-buffered saline</i>) ohne Ca/Mg | GIBCO BRL, Eggenstein |
| PCR-Puffer 1x10 Gene Amp TM CETUS, PD098059 | PERKIN ELMER Norwalk, USA |
| Photometrische Proteinbestimmung Reagenz A, S und B | BIOMOL, Hamburg |
| Proteinstandard für Lowry II | BIO RAD LABORATORIES, Norwalk, USA |
| PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamin) Eggenstein | BIO RAD LABORATORIES Norwalk, USA |
| Quiagen ^R Miniprep System Random Primer | GIBCO BRL, Norwalk, USA |
| RMPI 1640 Medium + L-Glutamin | QUIAGEN, Hilden |
| RNasin ^R (RNAse-Inhibitor) | BOEHRINGER, Mannheim |
| Roti-Quick-Kit ^R zur RNA-Isolierung | GIBCO, Paisley, Scotland |
| SDS (Sodiumdodezylsulfat) | PROMEGA, Madison USA |
| TA Cloning ^R Kit | ROTH, Karlsruhe |
| TEMED | ROTH, Karlsruhe |
| Trasylol ^R | INVITROGEN, San Diego, USA |
| Tris | SIGMA, Deisenhofen |
| Triton X-100 | BAYER, Leverkusen |
| Türk's Lösung | USB, Cleveland, USA |
| Wachskugeln | SERVA, Heidelberg |
| CETUS, | MERCK, Darmstadt |
| | PERKIN ELMER Norwalk, USA |

3.3 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig bezogen, mit Ausnahme der 32D-Zelllinie, welche uns freundlicherweise von Dr. Ken Mills, LRF Laboratories, Department of Haematology, University of Wales College of Medicine zur Verfügung gestellt wurde.

| | |
|-------|--|
| 32D | murine myeloische Zelllinie, IL-3 abhängig |
| K562 | humane CML-Zelllinie einer myeloischen Blastenkrise mit Philadelphia-Chromosom |
| HEL | humane Erythroleukämiezelllinie |
| U-937 | humane histiozytäre Lymphomzelllinie |
| HL-60 | humane promyelozytäre Leukämiezelllinie |
| KG-1 | humane myeloische Leukämiezelllinie |

3.4 Oligonukleotide für Antisense-Versuche

| | |
|---------------|--|
| trk Antisense | 5'-CCGTCCGCCTCGCAGCAT-3' Position 120-138 |
| trk Sense | 5'-ATGCTGCGAGGCGGACGG-3' Position 120-138 |

von ROTH, Karlsruhe

Human TrkA Antisense- und human TrkA Random-Control-Phosphothioate
von BIOGNOSTIK, Göttingen

3.5 PCR-Primersequenzen

trk-Primer

| | |
|---------------|---|
| Primer trk 11 | 5'-CCT GCT GGC TTG GCT GAT ACT-3' Position 183-204 |
| Primer trk 12 | 5'-GAG AGA GAC TCC AGA GCG TTG-3' Position 492-513 |

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| Primer trk 15 | 5'-CTG GCC ACA CGC AAC TGT CTA-3' |
| | Position 2052-2073 |
| Primer trk 16 | 5'-ACA TCG TTG ATG CTG TGG CGT-3' |
| | Position 2411-2432 |

β-Actin-Primer

| | |
|-----------|--|
| 3'-Primer | 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3' |
| | Position 1384-1415 |
| 5'-Primer | 5'-CGA GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GGA GA 3' |
| | Position 937-968 |

3.6 Antikörper

| | |
|---|---|
| Anti-Akt-1 | polyklonaler Antikörper aus Schafen gegen die Aminosäuren 466-480 des Akt-Proteins (Proteinkinase B) von UPSTATE BIOTECHNOLOGY, Lake Placid, USA |
| Phospho-Akt (Ser473) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen phosphoryliertes Serin an Position 473 des Akt-Proteins von BIOLABS, Beverly, USA |
| c-Fos (K-25) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen die Aminosäure 128-152 des humanen c-Fos-Proteins (p62) von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA |
| ERK 2 (K-23) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen die Aminosäuren 298-320 in der Subdomäne XI des ERK 2-Proteins (MAP-Kinase p42) von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA |
| Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204) | monoklonaler Antikörper aus Mäusen gegen phosphoryliertes Threonin an Position 202 und Tyrosin an Position 204 des Erk1-Proteins (MAP-Kinase p44) oder Erk2-Proteins (MAP-Kinase p42) von BIOLABS, Beverly, USA |
| Kip 1 | monoklonaler Antikörper aus Mäusen gegen die Aminosäuren 28-79 des p27 ^{Kip} -Proteins von TRANSDUCTION LABORATORIES, Santa Cruz, USA |
| p21(C-19) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen die Aminosäuren 146-164 des humanen p21 ^{Cip/Waf} -Proteins von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA |

| | |
|-----------------------|---|
| trk(C-14) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen die Aminosäuren 777-790 des TrkA-Proteins von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA |
| Phospho TrkA (Tyr490) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen phosphoryliertes Tyrosin an Position 490 des TrkA-Proteins von BIOLABS, Beverly, USA |
| Rb (C-15) | polyklonaler Antikörper aus Kanninchen gegen die Aminosäuren 914-928 des humanen Rb-Proteins (p110) von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA |

3.7 Lösungen

3.7.1 Agarosegelelektrophorese

| | |
|--------------------------|--|
| TAE-Elektrophoresepuffer | 40mM Tris-Acetat 1mM EDTA aqua dest. |
| Ladepuffer | 0,25% Bromphenolblau (w/v) 30% Glycerol (v/v) 0,25% Xylencyanol FF (v/v) aqua dest. |

3.7.2 Kinase-Assay

| | |
|-------------|---|
| Lysispuffer | 40mM NaF 10mM Na-Phosphat pH 7 10mM EDTA pH 7 1% Triton X-100 (v/v) 5% Trasylol ^R (v/v) aqua dest. |
| Waschpuffer | 1mM NaCl 40mM NaF 10mM Na-Phosphat pH 7 0,2% Triton X-100 (v/v) 5% Trasylol ^R (v/v) 10mM EDTA aqua dest. |

| | |
|-----------------------|--|
| Kinasepuffer | 20mMBis-Tris-Propan 20mM MnCl ₂ aqua dest. |
| ATP-Mix | 5μCi [³² P]-γATP 50μmol ATP Kinasepuffer ad 10μl |
| Quenchpuffer | 40mM NaF 100mM Na-Phosphat pH 7 10mM EDTA 1mM ATP aqua dest. |
| Probenpuffer | 80mM Tris-HCL pH 6,8 10% Glycerin (w/v) 5% 2-Mercaptoäthanol (v/v) 2% SDS (v/v) 0,01% Bromphenolblau (w/v) |
| Coomassie Färbelösung | 450ml Methanol 100ml Essigsäure (100%) 2,5g Coomassie aqua dest. ad 1000ml |
| Entfärbelösung | 450ml Methanol 100ml Essigsäure (100%) aqua dest. ad 1000ml |

3.7.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

| | |
|----------|--|
| Hauptgel | 7,5ml Acrylamid 3% mit Bisacrylamid 0,8% 11,2ml Tris-HCl 1M (pH 8,8) 150μl SDS 20% (v/v) 150μl Ammonium-Persulfat 10% (w/v) 30μl TEMED 11,2ml aqua dest. |
| Vorgel | 1,67ml Acrylamid 3% mit Bisacrylamid 0,8% 1,25ml Tris-HCl 1M (pH 6,8) |

50µl SDS 20% (v/v)
50µl Ammonium-Persulfat 10% (w/v)
15µl TEMED
7,0ml aqua dest.

Tris-Glycerin-Elektrophoresepuffer

15,1g Tris
94g Glycin
50ml SDS 10% (v/v)
aqua dest. ad 1000ml

3.7.4 Proteinaufbereitung für Western-Blotting

Lysispuffer

10mM Tris pH 8
50mM NaCl
5mM EDTA
30mM Natriumpyrophosphat
50mM NaF
1% Triton X-100 (v/v)
100 KIU/ml Trasylol^R
2mM PMSF
100µM Natriumorthovanadat
aqua dest.

Probenpuffer

100mM Tris-HCl pH 6,8
4% SDS (v/v)
0,2% Bromphenolblau (w/v)
20% Glycerol (v/v)
200mM DDT
aqua dest.

Transferpuffer

20mM Tris
60mM Glycin
20% Methanol (v/v)
aqua dest.

Blockierungslösung

PBS mit 0,1% Tween (v/v)
5% Trockenmilchpulver (w/v)

Waschlösung

PBS mit 0,1% Tween (v/v)

4 Methoden

4.1 Zellkulturen

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte aufgrund der Kontaminationsgefahr mit Bakterien oder Pilzen stets unter sterilen Bedingungen unter einem Laminar-Air-Flow. Es wurde Einmalmaterial verwendet und dies, soweit nicht vom Hersteller durchgeführt nochmals durch Dampfsterilisation entkeimt.

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt propagiert. Vor jeder Verarbeitung und jedem Zellkulturmediumwechsel erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellsuspension, um Zellschäden oder Kontaminationen auszuschliessen. Das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin, PSG und 5% FCS wurde entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen regelmässig erneuert. Die IL-3 abhängige D32 Zelllinie wurde in RPMI 1640 Medium mit 10% FetalcloneTM und 1ng/ml IL-3 Zusatz kultiviert.

4.1.1 Propagierung und Selektion des c-trk-Plasmids pDM69 in E.coli

Das Proto-trk c-DNA enthaltende Plasmid pDM69 in E.coli Stamm INVαF wurde nach der Anleitung des TA Cloning^R Kit von INVITROGEN, San Diego, USA vermehrt. Die E.coli wurden zunächst aufgetaut und je 50µl der vorgefertigten Bakteriensuspension mit 2µl 0,5M β-Mercaptoäthanol und 1µl Plasmidlösung (1ng/µl) gemischt und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Hiernach wurden die Ansätze für 30 Sekunden bei 42°C erhitzt und anschließend 2 Minuten auf Eis gelagert. Nun wurde jedem Ansatz 450µl SOC-Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37°C in einem Rüttler bewegt. Anschließend wurden 25µl bzw. 100µl der Ansätze auf LB-Agar-Platten mit 60µg/ml Ampicillin ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die ampicillinresistenten Kolonien wurden aufgenommen erneut über 12 Stunden in 5ml LB-Broth-Nährlösung mit 60µg/ml Ampicillin inkubiert. Durch die mit dem c-trk-Plasmid pDM69 übertragene Ampicillinresistenz wurden somit nur die erfolgreich transfizierten E.coli Bakterien selektiert.

4.1.2 Isolierung der erzeugten Plasmid DNA aus E.coli

Die Plasmid DNA aus den pDM69-trk transfizierten E.coli wurde nach der Anleitung des Quiagen^R Miniprep System von QUIAGEN, Hilden, Deutschland isoliert. Hierzu wurden je 1,5ml der zuvor mit Plasmid inkubierten E.coli Bakteriensuspension 20 Sekunden zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100µl Tris-EDTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 200µl 0,2M NaOH mit 1% SDS versehen und 5 Minuten auf Eis inkubiert, hiernach mit 150µl Kaliumazetatlösung, 23µl Essigsäure (100%) und 57µl aqua dest. gemischt und erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugieren der Ansätze wurde der Überstand abgenommen und jeweils zweimal mit 1ml 70% Äthanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstands wurde zuletzt das trockene Pellet in 20µl aqua dest. gelöst.

4.1.3 Transfektion von 32D Zellen mit dem Plasmid mit c-trk pDM69

Zur Tansfektion der 32D Zellen wurden jeweils 3×10^6 Zellen in 1,8ml Opti-MEM-Medium suspendiert und mit 6 µg der zuvor isolierten Plasmide und 15µl Lipofectin^R in 200µl Opti-MEM-Medium für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation in jeweils 4ml RPMI 1640 mit FetalcloneTM und IL-3 für 48 Stunden, bevor jeder Ansatz in 25ml RPMI 1640 mit 10% FetalcloneTM, 1ng/ml IL-3 und 0,25ng/ml G 418 aufgenommen wurde. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion der D32 Zellen wurde mit den transfizierten Zellen eine Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) mit trk-Primern durchgeführt.

4.2 Nukleinsäuren

4.2.1 Qualitätskontrolle der RNA, DNA und Amplifikationsprodukte

Bei der Arbeit mit geringsten RNA- und DNA-Mengen stellen mögliche Kontaminationen ein Problem dar. Zur Vermeidung erfolgte zusätzlich zu den bei dem Umgang mit Zellkulturen genannten Massnahmen noch eine räumliche Trennung der Präparation der Ansätze und der Amplifikation. Weiterhin wurde auf eine strenge Trennung der jeweils verwendeten Materialien und Pipetten zur RNA-Isolierung, zur cDNA-Herstellung und zur RT-PCR geachtet. Eine Kontamination eines Amplifikationsproduktes konnte durch negative Kontrollproben

erkannt werden. Bei Kontaminationsverdacht wurde der Versuch nicht in die Auswertung einbezogen.

4.2.2 RNA-Isolierung

Die Zellen aus der Zellsuspension wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und durch Zentrifugieren bei 4°C und 2000 UpM pelletiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der modifizierten Methode von Chomczynski [22], der Guadiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit dem Rotti-Quick-Kit^R zur RNA-Isolierung von ROTH, Karlsruhe. Der RNA-enhaltende Überstand wurde mit Äthanol versetzt und bei -80°C für 20 min präzipitiert.

4.2.3 Reverse Transkription

Die Synthese der komplementären DNA (Erststrangsynthese) aus der zuvor isolierten RNA erfolgte mittels der reversen Transkriptase aus dem Moloney Murinen Leukämievirus und Hexanukleotiden mit randomisierter Sequenz, entsprechend den Angaben des Herstellers (GIBCO-BRL, Eggenstein). Das zuvor isolierte RNA-Pellet wurde hierzu in aqua dest. resuspendiert und jeweils 4,5µl hiervon in einen 10 µl Ansatz bestehend aus

- 2,0µl First-Strand-Buffer 5 x
- 1,0µl dNTP
- 1,0µl Random-Primer
- 0,5µl RNasin^R
- 1,0µl M-MLV-Reverse-Transkriptase

in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation im PCR-Cycler für 1 h bei 37°C und 15 min bei 99°C. Die erhaltene c-DNA konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

4.2.4 β-Actin-RT-PCR

Bei jeder PCR wurde als Positivkontrolle eine Probe mit Primern für β-Actin, einem Kontrollgen, das in jeder Zelle exprimiert wird, mitgeführt. Die β-Actin-PCR wurde mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Damit die Reagenzien während der Amplifikationszyklen nicht verdampfen wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet.

Zunächst wurde ein 27µl Master-Mix bestehend aus

- 3µl PCR-Puffer 10 x
- 0,3µl AmpliTaq DNA Polymerase
- 20,7µl aqua dest.
- 1µl dNTP

10pmol 3' β -Actin-Primer

10pmol 5' β -Actin-Primer

in ein "thin walled"-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, mit 30 μ l Mineralöl überschichtet und zuletzt 3 μ l der c-DNA hinzugefügt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz über 35 Zyklen jeweils eine Minute bei 94°C (Denaturierung), eine Minute bei 60°C (*Annealing* =Primeranlagerung) und eine Minute bei 72°C (*Extension* =Synthesetemperatur für Taq-Polymerase) im PCR-Thermo-Cycler inkubiert.

4.2.5 trk-RT-PCR

Die trk-PCR wurde als " Hot-Start-Technik" durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde durch eine Wachsschicht in zwei Komponenten geteilt, die erst bei 80°C durch Schmelzen der Wachsschicht miteinander reagieren. Die bei langsamer Erwärmung auftretenden unspezifischen Amplifikationen wurden dadurch vermindert.

Der 20 μ l Master-Mix I bestehend aus

2 μ l PCR-Puffer 10 x

26pmol 3' trk-Primer

26pmol 5' trk-Primer

1 μ l dNTP

13 μ l aqua dest.

wurde in ein PCR-Reagenzgefäß vorgelegt und eine Wachskugel hinzugegeben. Durch 4 Minuten Erwärmen des Gemischs bei 80°C und anschließendes Abkühlen auf 45°C bildete sich über dem Ansatz eine geschlossene Wachsschicht.

Auf diese wurde der Master-Mix II pipettiert bestehend aus

1 μ l PCR-Puffer 10 x

3,7 μ l aqua dest

0,3 μ l AmpliTaq^R DNA Polymerase

5 μ l c-DNA.

Der gesamte Ansatz wurde nun im PCR-Cycler zunächst 5 Minuten bei 94°C erhitzt (*hot start*), anschließend folgten wie oben beschrieben 35 Zyklen zu je einer Minute bei 94°C, einer Minute bei 56°C und einer Minute bei 72°C.

4.3 Elektrophoresen

4.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Amplifikationsprodukte, für β -Actin 478 bp, für trk jeweils 330 bp bzw. 380 bp lang, wurden durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Hierzu wurde ein 2%iges Agarosegel in TAE-Elektrophoresepuffer gegossen. Die PCR-Produkte wurden mit Agaroselaufpuffer zusammen aufgetragen und 2-3 Stunden bei einer Spannung von 10mV pro cm Gellänge aufgetrennt. Als Maßstab wurde bei jedem Gel eine Basenpaarleiter von n*123 bp Länge mitgeführt. Zuletzt erfolgte eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid entsprechend den Protokollen nach Sambrook [99] und anschließend die Polaroidfotodokumentation auf einer UV-Lichtbank.

4.3.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zwischen zwei Glasplatten zur Trennung des Proteingemischs ein Hauptgel mit einem pH von 8,8 und darüber ein niedriger konzentriertes Vorgel mit einem pH von 6,8 gegossen. Die Proben wurden nach dem Denaturieren zunächst nochmals 3 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert und der Überstand vollständig in die Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann im Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer für 16-18 Stunden bei 35 mV. Als Maßstab wurde bei jedem Gel ein High-Molecular-Weight-Standard mit Proteinen der Molekulargewichte 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 und 205.000 Dalton mitgeführt. Das Gel wurde in der Coomassie-Lösung gefärbt, anschließend in der Entfärbelösung inkubiert, auf einem Filterpapier mit Haushaltsfolie überzogen und durch Vakuum-erwärmung getrocknet. Zuletzt konnte die Menge des markierten Proteins durch Exposition des getrockneten Gels in einer Röntgenfilmkassette mit Amplifikatorfolien (*Intensifying-Screens*) für 24 Stunden bis 3 Tage bei -80°C durch Schwärzung des Röntgenfilms nachgewiesen werden.

4.3.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Protein-DNA-Komplexe wandern aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer Molekülstruktur wesentlich langsamer durch ein Polyacrylamidgel als reine DNA-Fragmente oder Doppelstrangoligonukleotide. Diese Beobachtung machte man sich zum Nachweis von spezifisch DNA-bindenden Proteinen mit Hilfe des EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) zunutze. Hierzu wurde das zu untersuchende Protein mit durch Phosphor [32 P] radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, welche die für das Protein spezifische Bindungsstelle enthielten inkubiert. Als Kontrolle wurden in einem neuen Ansatz zusätzlich spezifische

Oligonukleotide hinzugegeben, welche die Proteinbindungsstellen der radioaktiv markierten DNA-Fragmente blockierten und in einem weiteren Kontrollansatz unspezifische Oligonukleotide hinzugegeben, welche keine spezifische DNA-Fragment-Bindungsstellen enthielten. Die Reaktionsprodukte wurden durch elektrophoretische Trennung in einem Polyacrylamidgel identifiziert.

Zur Darstellung der spezifischen Bindung von AP-1 an DNA wurde das Gel Shift Assay System von PROMEGA, Madison, USA entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

4.4 Kinase-Assay

Die Funktion der Tyrosinkinasen wurde durch ein *in-vitro* Kinase-Assay gemessen. Die Methode nach Erikson et al. [34] und Tamura et al. [115] wurde angewendet. Eine in der Neubauerkammer gezählte Menge von Zellen wurde zunächst zweimal durch jeweils 10 Minuten Zentrifugieren bei 2000 UpM und anschließendes Resuspendieren des Zellpellets in PBS gewaschen und dann in 1ml Lysispuffer gelöst. Das Lysat wurde 10 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert und der Überstand für 2 Stunden mit dem spezifischen Proteinkinase-Antikörper auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Antikörperpräzipitation für 30 Minuten mit Protein-A-Staphylokokkensuspension Stamm Cowan A. Hierbei kommt es zu einer Bindung der Protein-Antikörperkomplexe über den F_C-Teil an das Staphylokokkenprotein. Nach Waschen des Komplexes mit jeweils zweimal 1ml Waschpuffer und zuletzt 1ml aqua dest. und einminütigem Zentrifugieren bei 12.000 UpM wurde das Pellet in 5µl Kinasepuffer resuspendiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem [³²P]-γATP gemessen. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten mit 10µl ATP-Mix. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1ml Quench-puffer gestoppt. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 12.000 UpM wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 40µl Probenpuffer durch 5 Minuten Kochen im Wasserbad denaturiert. Das durch radioaktiv phosphoryliertes Tyrosin markierte Protein wurde in der Polyacrylamidgelelektrophorese durch Autoradiographie abgebildet.

4.5 Western-Blotting und Chemiluminiszenznachweis

Das Trk-Protein konnte sensitiv und mit gutem Auflösungsvermögen auf nicht-radioaktivem Weg mit Hilfe der Chemiluminiszenz nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS und 0,1mM Natriumorthovanadat gewaschen, durch 20 Minuten Zentrifugieren bei 14.000 UpM pelletiert, in 100µl

Lysispuffer gelöst und hiernach eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Proteinlysate 30 Minuten bei 14.000 UpM zentrifugiert und die Protein-konzentration des Überstands photometrisch bestimmt. Zur elektrophoretischen Trennung wurde die jeweilige Proteinmenge 1:1 (v/v) mit Probenpuffer versetzt, 6 Minuten im Wasserbad denaturiert und nach 3 Minuten Zentrifugieren des Überstands auf ein PAGE-Gel aufgetragen. Als Massstab wurde bei jedem Gel ein Rainbow^R-Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Molekulargewichte 30.000, 46.000, 66.000 und 220.000 Dalton mitgeführt. Nach 16-18 Stunden elektrophoretischer Auftrennung bei 35mV wurde das Gel zunächst 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und in einer Blotting-Kammer zwischen saugfähigen Filterpapieren für 8 Stunden bei 50 V auf eine Nitrocellulosemembran überführt.

Die Nitrocellulosemembran wurde hiernach für mehrere Stunden bei 4°C in einer Blockierungslösung inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und aqua dest. für eine Stunde mit dem entsprechenden Trk-Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit der Waschlösung erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden peroxidasemarkiertem anti-mouse oder anti-rabbit Sekundärantikörper. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran jeweils 1 Minute mit der Chemilumineszenzlösung 1 und 2 von AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig versehen [70] und für Minuten einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette mit *Intensifying-Screens* exponiert.

4.6 Photometrische Protein-und RNA-Mengenbestimmung

Um eine quantitative Aussage bezüglich der Proteinexpression der Zellen machen zu können, wurde nach dem Lösen der Zellen photometrisch der Proteingehalt des Zelllysates bestimmt und je Elektrophoresegelelektrode die gleiche Menge aufgetragen. Hierzu wurde zunächst ein Proteinstandard aus Rinderserumalbumin in aufsteigender Konzentration von 250, 500, 750, 1000 und 1360µg/ml erstellt und die Absorption im Photometer gespeichert. Das Proteinlysate wurde mit 500µl des Reagenz A, 20µl des Reagenz S und 4ml des Reagenz B von BIORAD LABORATORIES versehen und mit dem Proteinstandard photometrisch verglichen.

Die RNA-Mengenbestimmung erfolgte auch photometrisch, um mögliche quantitative Aussagen über eine eventuelle Suppression der Bildung von RNA durch Antisense-Oligonukleotide machen zu können. Hierzu wurden 2µl der isolierten RNA-Lösung mit 48µl aqua dest. gemischt und in einer Spezialküvette bei einer Basiskorrektur von 320 nm und einer Ratio von 260 nm (RNA)/ 280 nm (Proteine) der RNA-Gehalt bestimmt.

4.7 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test)

Das Überleben und die Aktivität der mit trk transfizierten 32D Zellen im Unterschied zu den nicht transfizierten 32D Wildtyp-Zellen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde mit dem MTT-Test entsprechend den Angaben von SIGMA, Deisenhofen gemessen.

Hierzu wurde jeder Zellansatz für 4 Stunden mit 10% MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Lösung (5mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Jetzt wurde den Ansätzen jeweils 100µl Isopropanol mit 5% Ameisensäure zugegeben und nach 3 Minuten Durchmischung die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wurde nur in aktiven Mitochondrien durch verschiedene Dehydrogenaseenzyme zu dem dunkelblauen Formazan-Farbstoff reduziert. Diese photometrisch quantifizierbare Farbstoffmenge ist ein Indikator für überlebende und stoffwechselaktive Zellen.

4.8 Zytopräparatherstellung

Die Zytopräparatherstellung erfolgte durch Zentrifugieren der Zellsuspension auf Reagenzträger in einer Zytozentrifuge. Die Probe wurde anschließend für 5 Minuten in May-Grünwald-Färbemix und 10 Minuten in Giemsa-Farblösung inkubiert und luftgetrocknet. Die Beurteilung erfolgte mit dem Lichtmikroskop Labovet FS (Leitz).

4.9 AB-Serumgewinnung

Neben dem fötalen Kälberserum wurde humanes Serum der Blutgruppe AB verwendet, da es weniger Nukleasen enthält.

AB-Serum wurde von Blutspendern aus der Blutbank der Justus-Liebig-Universität Gießen als Abfallprodukt erhalten. Die Gerinnung des Blutes wurde abgewartet, das überstehende Serum dekantiert und zweimal je 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Wasserbad für 1 Stunde bei 56°C sowie eine Aliquotierung unter sterilen Bedingungen und Lagerung bei -20°C.

5 Ergebnisse

5.1 β -Actin- und trk-RT-PCR mit RNA aus K562 und HEL

Zum Nachweis von trk-RNA in den Zelllinien HEL, K562 und U937 wurde die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte die Erststrangsynthese der komplementären DNA mittels der reversen Transkription. Durch die RT-PCR wurden aus dieser cDNA durch die entsprechenden Primer trk- und β -Actin-Sequenzen amplifiziert, die nach gel-elektrophoretische Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid auf der UV-Bank sichtbar gemacht wurden.

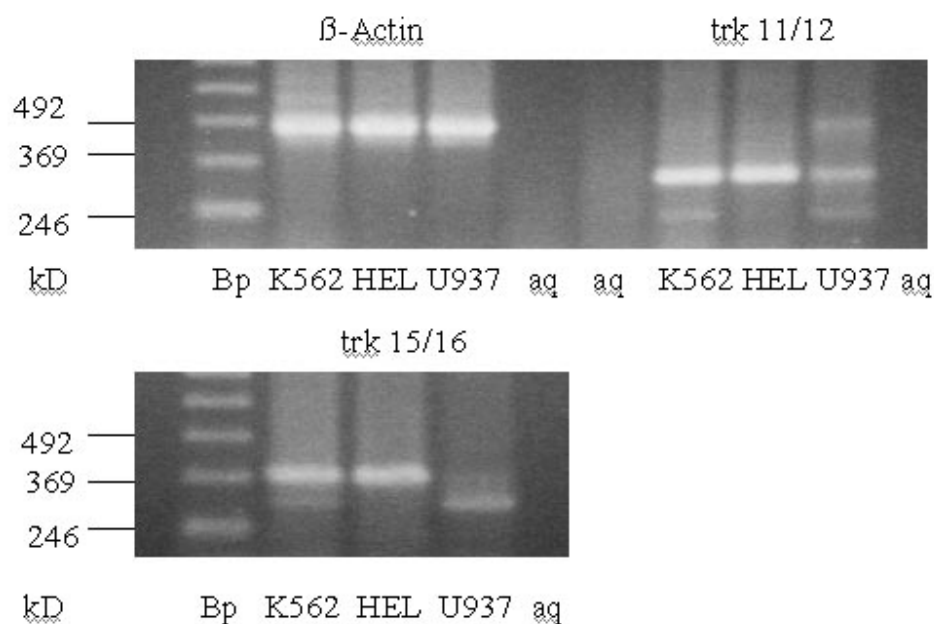


Abbildung 5

Agarosegel der RT-PCR mit trk 11/12-, trk 15/16- und β -Actin-Primern bei den Zelllinien K562, HEL und U937

Zu erkennen ist eine Bande bei der β -Actinprobe in allen drei Zelllinien. Bei den trk-Primern 11/12 und 15/16 zeigt sich eine deutliche Banden bei den Zelllinien K562 und HEL. Die Bande bei den Primern trk11/12 ist bei U937 schwach und bei trk 15/16 nicht zu erkennen. Dies ist bei nachfolgendem positivem Trk-Proteinnachweis mit einem Unterschreiten der Nachweisgrenze in diesem Versuch zu erklären. (aq = aqua dest. Negativkontrolle, Bp = Basenpaarleiter).

Aus den Ergebnissen in Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die für die nachfolgenden Versuche verwendeten Zelllinien K562 und HEL eindeutig trk-RNA bilden. Bei U937 ist eine schwache Amplifikation von trk bei den Primern 11/12 zu sehen, jedoch keine Expression mit den Primern 15/16. Da nachfolgende Versuche einen Nachweis des Trk-Proteins in U937 belegen ist die fehlende Bande bei den Primern trk 15/16 eher durch ein Unterschreiten der Nachweisgrenze in diesem Versuch zu erklären. Die β -Actinproben sind alle positiv, die Negativkontrollen mit aqua dest. zeigen keine Reaktion.

5.2 β -Actin- und trk-RT-PCR mit RNA von AML-Patienten

Zum Nachweis der trk-RNA in primären Leukämiezellen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) wurde eine β -Actin- und eine trk-RT-PCR nach Isolierung von RNA aus Blut- bzw. Knochenmarkspunktaten der Patienten durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde jeweils aqua dest. verwendet. Hierbei zeigte sich, dass das trk-RT-PCR-Produkt bei fünf der sieben untersuchten Patienten eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6). In den Proben der Patienten 5 und 6 konnten keine trk-RNA nachgewiesen werden. Das Fehlen der Bande von U937 in der trk15/16-RT-PCR wurde zuvor diskutiert. In den Proben der Patienten 1-4 und 7 und in den Zelllinien K562 und HEL konnte das trk-RT-PCR-Produkt nachgewiesen werden.

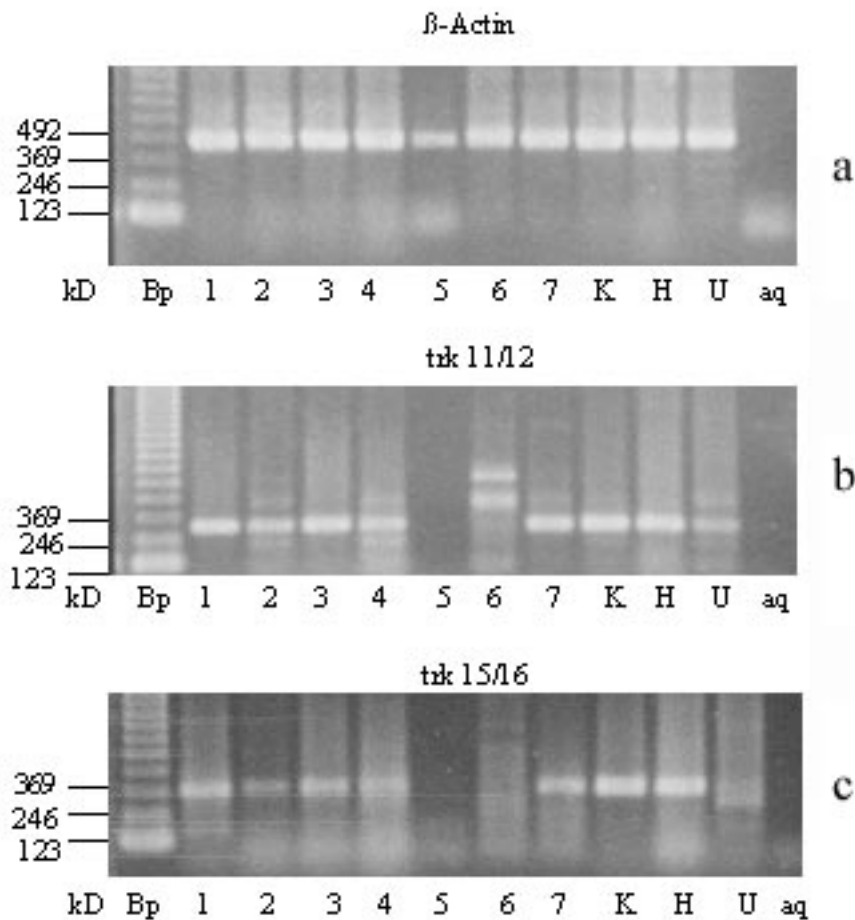


Abbildung 6

Agarosegel der RT-PCR mit trk 11/12, trk 15/16 und β-Actin-Primern von RNA aus Zellen von sieben Patienten mit akuter myeloische Leukämie

Es zeigt sich eine Bande bei allen Proben in der β-Actin-RT-PCR. Bis auf Probe 5 und 6 ist eine Bande bei allen Proben der trk 11/12-RT-PCR zu erkennen. Ebenfalls in der trk 15/16-RT-PCR lässt sich keine Bande bei Probe 5 und 6 erkennen, zusätzlich zeigt U937 wie im vorhergehenden Versuch keine Bande bei den trk 15/16 Primern. Die übrigen Proben sind positiv. Hiermit konnte bei den Patienten 1 bis 4 und 7 und bei K562 und HEL trk-RNA eindeutig nachgewiesen werden.

a = β-Actin-RT-PCR, b = trk 11/12-RT-PCR, c = trk15/16-RT-PCR,

1-7 = RNA aus Zellen von Patienten mit AML, K = K562, H = HEL, U = U937.

5.3 Untersuchung der Expression von p140^{Trk} (Trk) in den Zelllinien K562, CML-T1, U937 und HEL

Um zu belegen, dass trk nicht nur auf RNA-Ebene der untersuchten Zellen vorhanden ist, sondern auch als Protein exprimiert wird, wurde Trk durch die autophosphorylierende Kinasereaktion in seiner funktionellen Eigenschaft durch den Antikörper trk(C-14) nachgewiesen (Abbildung 7). Hierbei erfolgte nach Lyse der Zellen eine Isolierung des Trk-Proteins mittels Antikörperinkubation. Anschließend wurde das antikörpergebundene Trk durch Staphylokokken-suspension mit Bindung an das F_C-Fragment des Antikörpers präzipitiert. Die weiterhin bestehende autophosphorylierende Funktion des Kinaseabschnittes des Trk-Proteins konnte durch Inkubation mit radioaktiv markiertem [³²P]-γATP nachgewiesen werden. Hierbei wurde das markierte Phosphor an das Trk-Protein gebunden und konnte nach Gelelektrophorese durch Schwärzung des exponierten Röntgenfilms dargestellt werden. Als Negativkontrolle wurde die trk-negative Zelllinie CML-T1 verwendet. Die Ergebnisse in Abbildung 7 zeigen einen eindeutigen Trk-Nachweis bei HEL, K562 und U937. CML-T1 ist negativ. Der Nachweis von Trk bei der Zelllinie U937, die bisher als Trk-negativ galt ist neu.

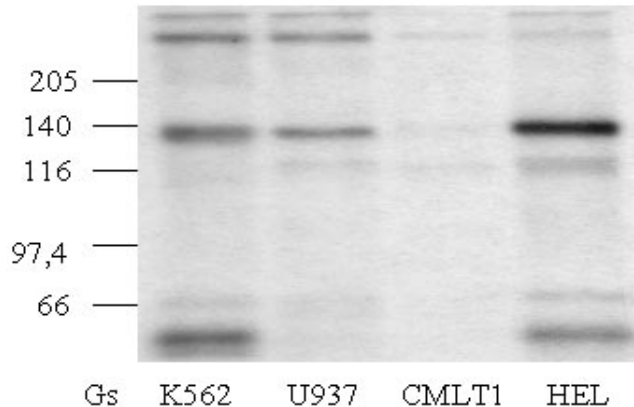


Abbildung 7

Röntgenfilm des Kinase-Assays der Zelllinien K562, U937, CML-T1 und HEL mit trk(C-14) Antikörper

Das Kinase-Assay wurde mit zweistündiger Inkubation mit dem trk(C-14) Antikörper und radioaktiver Markierung mit [³²P] durchgeführt. Es zeigt sich eine deutliche Bande bei 140.000 Dalton bei K562, HEL und U937. Bei der Zelllinie CML-T1 wird Trk nicht nachgewiesen. Neu ist der Nachweis von Trk bei der Zelllinie U937, die bisher als trk-negativ galt. Hiermit wurde die Zelllinie als weitere Negativkontrolle von trk ausgeschlossen. Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton.

5.4 Wirkung der Oligonukleotide auf die Expression von Trk

Um die Wirkung von trk-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden auf die Trk-Expression zu untersuchen, wurden zunächst je 500.000 Zellen HEL und K562 für 24 und für 48 Stunden mit 1 μ M Antisense- und Sense-Oligonukleotide von der Firma ROTH und 48 Stunden mit 1 μ M Antisense- und Random-Control-Oligonukleotide von der Firma BIOGNOSTIK inkubiert. Die Antisense- und Sense-Oligonukleotide von der Firma ROTH wurden nach unseren eigenen Sequenzvorgaben hergestellt (siehe 3.4 Oligonukleotide für Antisense-Versuche). Die Antisense-Oligonukleotide der Firma BIOGNOSTIK enthalten eine mehrfach erfolgreich verwendete geheime Basensequenz, während die Random-Control-Oligonukleotide von BIOGNOSTIK eine aus der gleichen Basenverteilung der Antisense-Oligonukleotide zufällig zusammengesetzte Sequenz enthält. Es wurde jeweils eine Kontrollprobe ohne Oligonukleotide mitgeführt. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen zur Synchronisierung des Zellzyklus zunächst für 4 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Erst danach wurden die Oligonukleotide zusammen mit dem AB-Serum hinzugegeben.

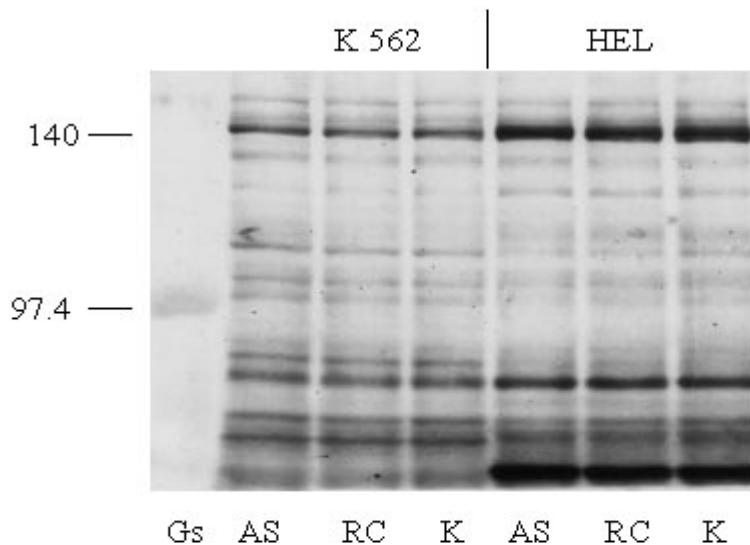


Abbildung 8

Western-Blot der Zelllinien K562 und HEL nach 48 Stunden Inkubation mit 1 μ M Oligonukleotiden von BIOGNOSTIK

Western-Blot des Proteinlysates von 500.000 Zellen der Zelllinie K562 und HEL nach 48 Stunden Inkubation mit 1 μ M Antisense- und Random-Control-Oligonukleotide von BIOGNOSTIK. Die Oligonukleotide wurden den Versuchsansätzen in gleicher Konzentration jeweils nach 24 Stunden Inkubation erneut hinzugefügt. Hierbei zeigt sich keine Beeinflussung der Bandenstärke von Trk in den unterschiedlichen Versuchsansätzen.

Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, AS = Antisense-Oligonukleotide, RC = Random-Control-Oligonukleotide, K = Kontrolle ohne Oligonukleotidzusatz.

In Abbildung 8 ist repräsentativ das Ergebnis des 48 Stundenversuchs mit Oligonukleotiden von BIOGNOSTIK dargestellt. Es zeigt sich bei der Antisense-, der Radom-Control- und der Kontrollprobe eine deutliche Bande gleicher Intensität bei 140 kD. Es fand sich hiermit also keine messbare Beeinflussung der Trk-Expression durch die Oligonukleotide. Weitere Versuche mit demselben Versuchsaufbau mit einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden unter Verwendung der Oligonukleotide von ROTH zeigte ebenfalls keine messbare Veränderung der Trk-Bande bei 140 kD.

Um einen Einfluß auf *trk*-RNA beobachten zu können wurde aus den mit Oligonukleotiden inkubierten Zellen und ihren Kontrollproben RNA isoliert und die daraus erhaltene c-DNA über PCR amplifiziert. Es wird hier exemplarisch ein Versuch mit einer Ausgangszahl von jeweils 500.000 Zellen und einer Inkubationszeit von 24 Stunden gezeigt (Abbildung 9).

Wie beim Protein, sieht man auch hier jeweils gleichstarke Banden bei den *trk*-Primer spezifischen Molekulargewichten. Hiermit konnte eine Beeinflussung der *trk*-Expression unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

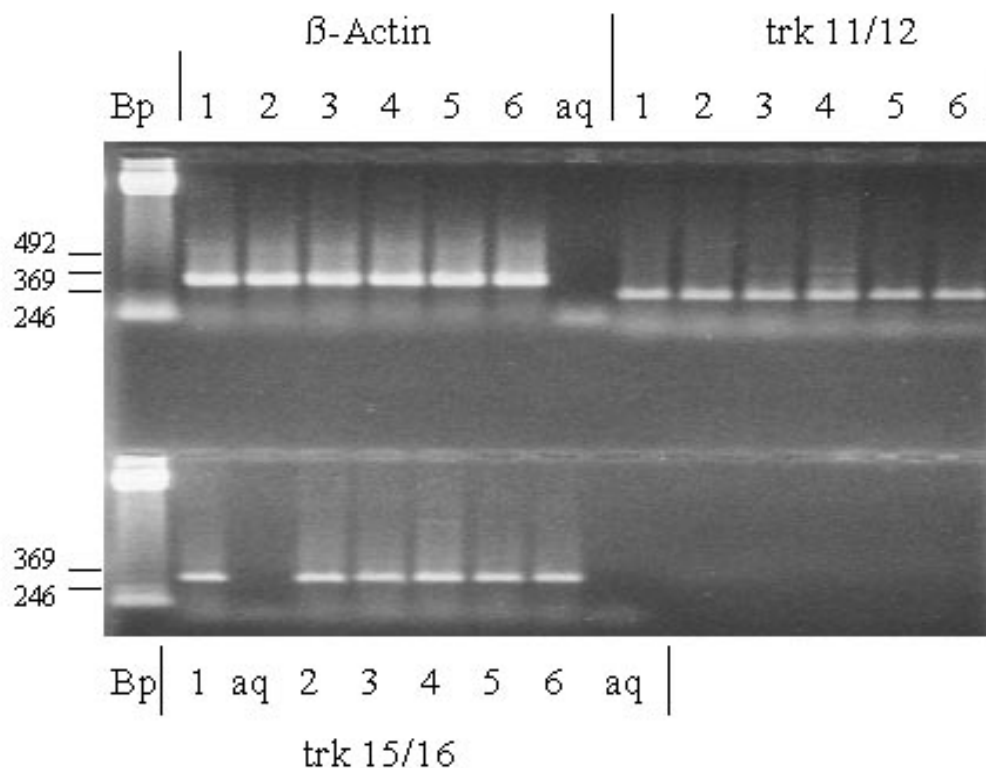


Abbildung 9

Agarosegel der RT-PCR mit trk 11/12, trk 15/16 und β -Actin-Primern bei HEL und K563 nach 48 Stunden Inkubation mit $1\mu\text{M}$ Oligonukleotiden von ROTH

Agarosegel der RT-PCR (30 Zyklen) mit trk11/12, trk 15/16 und β -Actin-Primern bei HEL und K562 nach 48 Stunden Inkubation von jeweils 500.000 Zellen mit $1\mu\text{M}$ Oligonukleotiden von ROTH und anschließender RNA-Isolierung. Es zeigt sich eine Bande bei allen Proben in der β -Actin-RT-PCR. Ebenfalls finden sich bei der trk11/12- und trk15/16-RT-PCR gleichstarke Banden bei allen Ansätzen. Es ist hierbei auf RNA-Ebene keine Beeinflussung von trk durch die Oligonukleotide unter diesen Versuchsbedingungen nachzuweisen.

1 = K562 mit Antisense-Oligonukleotiden

2 = K562 mit Sense-Oligonukleotiden

3 = K562 Kontrolle ohne Zusätze

4 = HEL mit Antisense-Oligonukleotiden

5 = HEL mit Sense-Oligonukleotiden

6 = HEL Kontrolle ohne Zusätze

Bp = Baasenpaarleiter.

Um den Einfluß des AB-Serums auf die Stabilität, die zelluläre Aufnahme und die Wirkung der Oligonukleotide zu vermindern, wurden bei den folgenden Versuchen die gewaschenen Zellen zunächst für 4 Stunden in serumfreiem Medium mit den Oligonukleotiden inkubiert und erst anschließend das AB-Serum hinzugefügt. Hierbei wurden 500.000 Zellen K562 und HEL 24 Stunden, 48 Stunden und 6 Tage (144 Stunden) mit 1µM und 10µM Sense- und Antisense-Oligonukleotiden von ROTH und BIOGNOSTIK inkubiert.

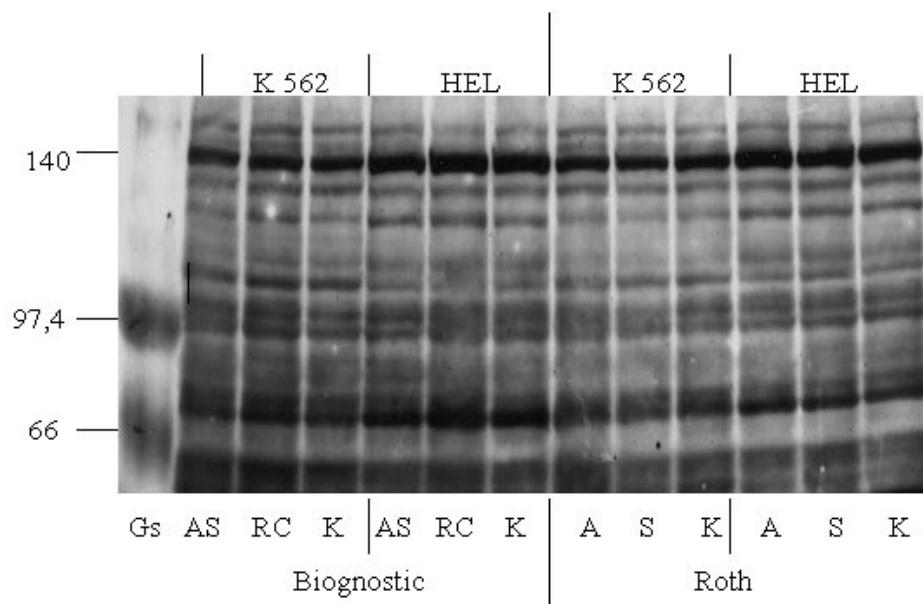


Abbildung 10

Western-Blot der Zelllinien K562 und HEL nach 144 Stunden Inkubation mit 1µM Oligonukleotiden von ROTH und BIOGNOSTIK

Western-Blot des Proteinlysates von 500.000 Zellen der Zelllinien K562 und HEL nach 144 Stunden Inkubation mit 1µM Oligonukleotide von ROTH und BIOGNOSTIK. Die Oligonukleotide wurden jeweils in gleicher Konzentration nach 48 und 96 Stunden Inkubation den Versuchsansätzen erneut hinzugefügt. Hierbei zeigte sich keine Beeinflussung der Bandenstärke von Trk in den unterschiedlichen Versuchsansätzen.

AS = Antisense-Oligonukleotide von BIOGNOSTIK

RC = Random-Control-Oligonukleotide von BIOGNOSTIK

A = Antisense-Oligonukleotide von ROTH

S = Sense-Oligonukleotide von ROTH

K = Kontrolle ohne Oligonukleotidzusatz

Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton.

Exemplarisch ist in Abbildung 10 das Ergebnis des Versuchs mit einer Inkubationszeit von 6 Tagen mit der Oligonukleotidkonzentration von 1µM gezeigt, wobei eine erneute Oligonukleotidzugabe nach den ersten 48 Stunden und nach 96 Stunden stattfand. Bei insgesamt, entwicklungsbedingt stärkerer Schwärzung des Röntgenfilms zeigen sich keinerlei Unterschiede in der Trk-Bandenstärke bei 140 kD sowie in den übrigen Banden.

Weitere Versuche mit dem genannten Versuchsaufbau mit einer Inkubationszeit von 24 und 48 und 144 Stunden unter Verwendung der Oligonukleotide von ROTH und BIOGNOSTIK in einer Konzentration von 1 und 10µM zeigten ebenfalls keine messbare Veränderung der Trk-Bande bei 140 kD.

Bei weiteren Versuchen wurde zusätzlich zu der serumfreien Inkubation für 4 Stunden zusammen mit den Oligonukleotiden Lipofectin^R in 200µl OptiMEM in den Mengen 1, 5 und 10µg pro Ansatz hinzugegeben. Durch ein "Ummanteln" der Oligonukleotide mit Lipofectin^R wurde versucht die Aufnahmemenge der Oligonukleotide in die Zellen und damit ihre Wirksamkeit zu vergrößern. Es wurden verschiedene Versuchsansätze mit Oligonukleotidmengen von 0,1 bis 10,0µg pro Ansatz und einer Inkubationsdauer von 48 bis zu 6 Tagen gewählt. Auch bei dieser Versuchsanordnung kam es zu keiner messbar veränderten Trk-Expression (siehe Tabelle 1).

| Nr | Zellzahl | Inkubationszeit in h | Oligonukleotidkonzentration in μM | Oligonukleotide von ROTH | Oligonukleotide von BIOGNOST IK | 4 h serumfrei inkubiert | Lipofectin ^R - zusatz in μg |
|----|-----------------|----------------------|--|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|---|
| 1 | 5×10^5 | 24 | 1 | + | - | - | - |
| 2 | 5×10^5 | 24+24 | 1 | + | - | - | - |
| 3 | 5×10^5 | 24+24 | 1 | - | + | - | - |
| 4 | 5×10^5 | 24 | 1 | - | + | + | - |
| 5 | 5×10^5 | 48 | 1 | - | + | + | - |
| 6 | 5×10^5 | 24+24 | 10 | - | - | + | - |
| 7 | 5×10^5 | 24+24 | 1 | + | - | + | - |
| 8 | 5×10^5 | 24+24 | 10 | + | + | + | - |
| 9 | 5×10^5 | 48+96 | 1 | + | + | + | - |
| 10 | 5×10^5 | 48 | 1 | + | + | + | 1, 5, 10 |
| 11 | 1×10^6 | 48 | 1 | + | - | + | 1, 5, 10 |
| 12 | 2×10^6 | 48 | 0,1 | + | - | + | 1, 5, 10 |
| 13 | 2×10^6 | 72+72 | 0,5 | + | - | + | 1, 5, 10 |
| 14 | 2×10^6 | 24 | 0,5 | + | - | + | 1, 5, 10 |
| 15 | 2×10^6 | 72+72 | 0,5 | - | + | + | 1, 5, 10 |
| 16 | 2×10^6 | 48 | 0,5 | - | + | + | 1, 5, 10 |
| 17 | 2×10^6 | 72+72 | 5, 10 | + | + | + | 5, 10 |

Tabelle 1

Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuchsansätze mit Oligonukleotiden

Dargestellt sind alle Versuchsansätze mit Angaben über die Ausgangszellzahl, die Inkubationszeiten mit Oligonukleotiden, die Oligonukleotidkonzentration in μM , des Oligonukleotidherstellers, der Angabe, ob der Ansatz zunächst 4 Stunden serumfrei inkubiert wurde und der Lipofectin^R-Zugabe in μg . Bei den Inkubationszeiten sind die Zeiten nach erneuter Zugabe der Oligonukleotide in gleicher Ausgangskonzentration vermerkt (z.B. 24+24 = erneute Zugabe der Oligonukleotide nach 24 Stunden bei einer Inkubationszeit von insgesamt 48 Stunden). Die Versuche wurden zum Teil mehrmals wiederholt, keiner der Ansätze erbrachte eine Veränderung der Gesamtmenge des Trk-Proteins oder der trk-RNA.

5.5 Wirkung der Oligonukleotide auf das Zellkulturwachstum

| | Zellzahl | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| Ansatz | Antisense | Sense/RC | Kontrolle |
| K562 ROTH | 1.190.000 | 1.203.000 | 1.130.000 |
| K562 BIO | 1.210.000 | 1.180.000 | 1.210.000 |
| HEL ROTH | 1.390.000 | 1.420.000 | 1.400.000 |
| HEL BIO | 1.465.000 | 1.550.000 | 1.490.000 |

Tabelle 2

Zellzahlen der Zelllinien K562 und HEL nach 48 Stunden Inkubation mit Oligonukleotiden

Mittelwerte der Zellzahlen aus 3 Versuchsansätzen der Zelllinien K562 und HEL mit einer Ausgangszellzahl von 5×10^5 Zellen bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ Oligonukleotide von ROTH und BIOGNOSTIK und einer Kontrollprobe ohne Oligonukleotidzusatz. Die Zellen wurden jeweils nach 48 Stunden dreimalig in der Neubauerkammer gezählt. RC = Random-Control, BIO = BIOGNOSTIK.

| | Zellzahl | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| Ansatz | Antisense | Sense/RC | Kontrolle |
| K562 ROTH | 1.620.000 | 1.725.000 | 1.650.000 |
| K562 BIO | 1.590.000 | 1.600.000 | 1.555.000 |
| HEL ROTH | 2.890.000 | 2.690.000 | 1.970.000 |
| HEL BIO | 2.990.000 | 3.025.000 | 2.970.000 |

Tabelle 3

Zellzahlen der Zelllinien K562 und HEL nach 144 Stunden Inkubation mit Oligonukleotiden

Mittelwerte der Zellzahlen aus 3 Versuchsansätzen der Zelllinien K562 und HEL mit einer Ausgangszellzahl von 5×10^5 Zellen bei einer Inkubationszeit von 144 Stunden (6 Tage) mit $1 \mu\text{M}$ Oligonukleotide von ROTH und BIOGNOSTIK und einer Kontrollprobe ohne Oligonukleotidzusatz. Die Zellen wurden jeweils nach 144 Stunden dreimalig in der Neubauerkammer gezählt. RC = Random-Control, BIO = BIOGNOSTIK.

Neben der Wirkung der Oligonukleotide auf die trk-Expression wurde auch die auf das Wachstum der Zellkulturen untersucht. Die Entwicklung der Zellzahlen von HEL und K562 wurde bei einer Ausgangszahl von jeweils 500.000 Zellen unter Einwirkung von Oligonukleotiden von ROTH und BIOGNOSTIK nach 48 Stunden und 6 Tagen in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verglichen (exemplarisch in Tabelle 2 und 3 gezeigt). Hierbei konnte, wie auch in den anderen Versuchen mit unterschiedlicher Zellausgangszahl und Oligonukleotidkonzentration keine signifikante Änderung der Wachstumsrate durch die unterschiedliche Behandlung gesehen werden. Auch hatte das hinzugefügte Lipofectin^R keine Auswirkung auf das Zellkulturwachstum.

5.6 Zellmorphologie

Um zu untersuchen, ob die Oligonukleotide einen Einfluss auf die Reifung und Differenzierung der Zellen hatten, wurden bei allen genannten Versuchsansätzen zytologische Untersuchungen durchgeführt. Die Präparate wurden durch Zentrifugieren der Zellsuspension auf Reagenzträger in der Zytocentrifuge und Färbung in May-Grünwald- und Giemsa-Färbung hergestellt. Anschließend wurden sie luftgetrocknet und unter dem Mikroskop beurteilt. Hierbei wurden keine mit dem Lichtmikroskop erfassbaren Veränderungen beobachtet.

5.7 Expression und Phosphorylierung von Erk und Akt

5.7.1 Erk-Expression und Phosphorylierung bei 32D-trk und K562-trk nach NGF-Inkubation

Da die Inkubation mit Antisense-Oligonukleotiden ohne messbaren Effekt auf das Zellwachstum und die Zellmorphologie in den verwendeten neoplastischen Zelllinien HEL und K562 war und somit keine weitere Aussage zu der Funktion von trk möglich war, wurde im zweiten Teil der Arbeit mit trk transfizierte und wachstumsfaktorabhängige Zelllinien im Vergleich zu ihren nicht trk exprimierenden Wildtypen untersucht. Hierbei konnten speziell die Wirkung des Trk-Liganden NGF und der intrazellulären Signalkaskadeproteine Hinweise auf die Funktion von trk in diesen Zelllinien geben. Der genaue Ablauf der Signalwirkung innerhalb der Zelle wurde in folgenden Versuchen untersucht.

Nach der Ligandenbindung von NGF am Trk-Rezeptor erfolgt die Weiterleitung des Signals über verschiedene ineinandergreifende Kaskaden von Phosphorylierungen von Signaltransduktionsproteinen. Ein solcher Weg verläuft über die Aktivierung der GTPase Ras, welche an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankert ist und über Raf bis zu den mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP), die auch als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet werden. Hierzu gehört Erk1 mit dem Genprodukt p44 und Erk2 mit dem Genprodukt p42. Beide sind Serin-Threonin-Proteinkinasen, die selber durch die Phosphorylierung an Threonin- und Thyrosinresten, insbesondere am Threoninrest 202 und Thyrosinrest 204 aktiviert werden.

Zum Nachweis dieser Aktivierung durch NGF wurden neben den transfizierten 32D Zellen (32D-trk) auch mit trk transfizierte K562 Zellen (K562-trk) verwendet. Da zuvor eine Expression von Trk bei den nicht transfizierten K562 Zellen (K562-wt (Wildtyp)) nachgewiesen wurde, wurde durch zusätzliche trk-Transfektion eine Überexpression erreicht. Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden

in RPMI 1640 Medium mit 0,5% Fetalclone™ inkubiert. Anschließend wurden sie in serumfreien Medium aufgenommen und es wurde für jeweils 10 Minuten oder 1 Stunde NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Anschließend erfolgte die sofortige Proteinlysataufbereitung der Proben und Auftragung auf ein PAGE-Gel zur Durchführung eines Western Blotting und Nachweis von Erk und Phospho-Erk mit spezifischen Antikörpern durch Chemilumineszenzreaktion.

Als Kontrollproben wurden jeweils Proben ohne NGF und die gleichen Versuchsreihen bei den Wildtypen 32D-wt und K562-wt durchgeführt.

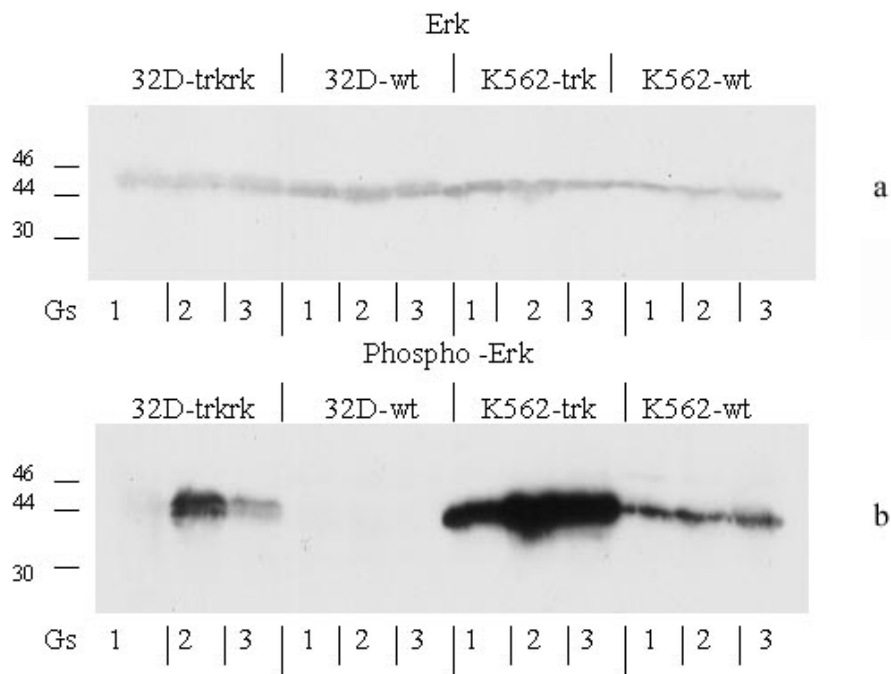


Abbildung 11

Erk-Expression und Phosphorylierung bei 32D-trk, 32D-wt, K562-trk und K562-wt nach NGF-Inkubation

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien 32D-trk, 32D-wt, K562-trk und K562-wt ohne NGF, nach 10 Minuten und 1 Stunde Inkubation mit NGF 100ng/ml, je 100µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich eine gleichmässige Proteinmenge in allen Zelllinien, die Phosphorylierung von Erk nach NGF-Inkubation ist bei 32D-trk und K562-trk deutlich zu erkennen.

a = Inkubation mit Erk 2 Antikörpern, b = Inkubation mit Phospho-Erk Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne NGF, 2 = 10 Minuten NGF, 3 = 1 Stunde NGF.

Wie zu erwarten, zeigen die Ergebnisse in Abbildung 11 eine gleichmässige Proteinbandenstärke für Erk in allen Versuchsansätzen der gleichen Zelllinie. Das Protein wird in allen Zelllinien in gleicher Menge exprimiert, unabhängig von den Versuchsbedingungen. Deutlich ist jedoch eine vermehrte Aktivierung durch Phosphorylierung in den mit NGF behandelten Zellen bei der Trk exprimierenden Zelllinien 32D-trk und K562-trk und ebenso, entsprechend schwächer im Signal bei der geringer Trk exprimierenden Zelllinie K562-wt. Zusätzlich ist eine vermehrte Phosphorylierung von Erk nach 10 Minuten NGF-Einwirkung im Gegensatz zu 1 Stunde NGF-Einwirkung zu erkennen, was für eine zeitabhängige Aktivierungsreaktion spricht. Bei den Zelllinien K562-trk und K562-wt zeigt sich zusätzlich eine vorhandene Aktivierung von Erk ohne Bindung von NGF an den Rezeptor. Erk als Schnittstelle von unterschiedlichen Signalkaskadewegen könnte hier durch eine andere Aktivierungsreaktion phosphoryliert worden sein. Die Trk-negative Zelllinie 32D-wt zeigt keinerlei Aktivierung von Erk unter den genannten Versuchsbedingungen.

5.7.2 Akt-Expression und Phosphorylierung bei 32D-trk nach NGF-Inkubation

Neben dem Signaltransduktionsweg über das Ras/Raf-MAP-Kinasesystem existiert ein weiterer Weg von dem aktivierten Trk-Rezeptor über die Phosphatidyl-inositol-3'-kinase (PI3-Kinase) zu dem Signalprotein p60^{Akt}, das auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet wird. Bei Aktivierung des Proteins erfolgt eine Phosphorylierung am Threoninrest 308 und Serinrest 473. Zum Nachweis dieser Aktivierung durch NGF wurden die 32D-trk und 32D-wt Zellen für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM inkubiert. Hiernach wurden sie in serumfreien Medium aufgenommen und es wurde für 10 Minuten, 1 Stunde oder 24 Stunden NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Anschließend erfolgte die sofortige Proteinlysataufbereitung der Proben und Auftragung auf ein PAGE-Gel zum Western Blotting und Nachweis von Akt und Phospho-Akt mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden Proben ohne NGF-Inkubation verwendet.

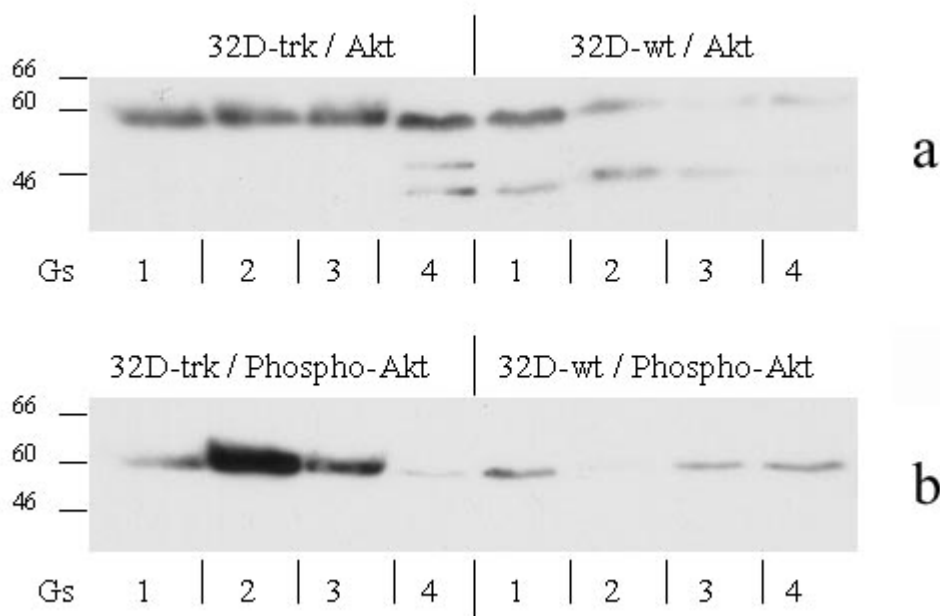


Abbildung 12

Akt-Expression und Phosphorylierung bei 32D-trk und 32D-wt nach NGF-Inkubation

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien 32D-trk und 32D-wt ohne NGF, nach 10 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden Inkubation mit NGF 100ng/ml, je 50µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich eine gleichmässige Proteinmenge von Akt in der jeweiligen Zelllinie, zusätzlich findet sich eine deutliche Phosphorylierung von Akt nach NGF-Inkubation bei 32D-trk.

a = Inkubation mit Akt Antikörpern, b = Inkubation mit Phospho-Akt Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton. 1 = ohne NGF, 2 = 10 Minuten NGF, 3 = 1 Stunde NGF, 4 = 24 Stunden NGF.

Es fand sich zunächst eine innerhalb der Zelllinie gleichmässige Expression des Akt-Proteins, jedoch ist die Expression bei den 32D-wt Zellen etwas geringer als bei den transfizierten Zellen. Die Zunahme der Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 ist bei den transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen nach NGF-Inkubation deutlich zu erkennen. Auch bei diesem Signalprotein ist eine deutliche Zeitabhängigkeit der Aktivierungsreaktion zu beobachten. Wiederum zeigt sich nach 10 minütiger NGF-Inkubation die stärkste Reaktion.

5.7.3 Inhibition der Phosphorylierung von Akt und Erk durch den trk-spezifischen Kinaseinhibitor K252a

K252a ist ein spezifischer Proteinkinaseinhibitor für den NGF-Rezeptor Trk. Um die Wirkung von K252a auf die Signalkaskade an NGF inkubierten 32D-trk Zellen zu untersuchen, wurden diese für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in serum-freien Medium aufgenommen und entweder mit 100µM K252a allein, 100ng/ml NGF allein oder mit 100µM K252a und 100ng/ml NGF für 10 Minuten inkubiert. Bei der Inkubation mit NGF und K252a wurden die Zellen zunächst für eine Stunde in serumfreien Medium mit K252a inkubiert und erst danach wurde NGF für 10 Minuten hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Proteinlysataufbereitung der Proben und Western Blotting zum Nachweis von Akt, Phospho-Akt, Erk und Phospho-Erk mit den spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden jeweils Proben ohne NGF und K252a verwendet.

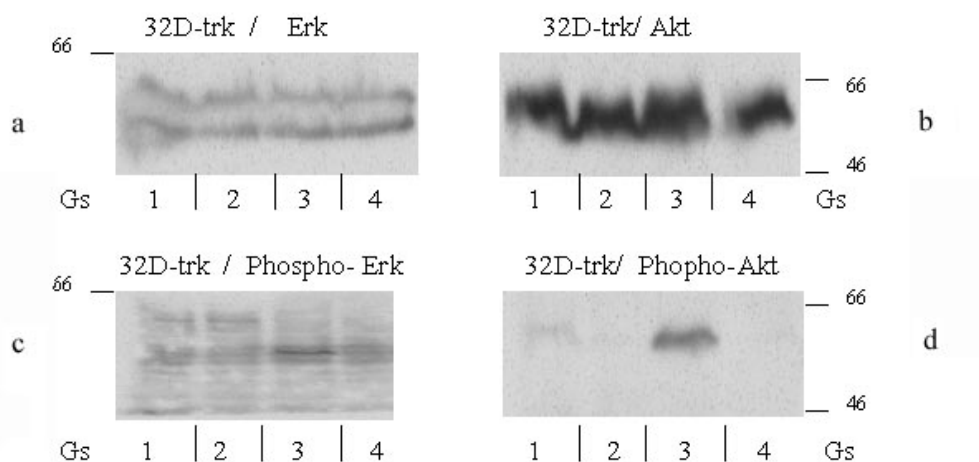


Abbildung 13

Inhibition der Phosphorylierung von Akt und Erk durch den trk-spezifischen Kinaseinhibitor K252a

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien 32D-trk ohne Zusatz, nach Inkubation mit K252a, nach 10 Minuten Inkubation mit NGF und nach Inkubation mit K252a und NGF, je 100µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich eine gleichmässige Protein-menge von Akt und Erk; die Phosphorylierung von Akt und Erk nach NGF-Inkubation wird durch K252a aufgehoben.

a = Inkubation mit Erk-Antikörpern, b = Inkubation mit Akt Antikörpern, c = Inkubation mit Phospho-Erk Antikörpern, d = Inkubation mit Phospho-Akt Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne Zusatz, 2 = K252a, 3 = NGF, 4 = K 252a und NGF.

Die Ergebnisse in Abbildung 13 zeigen eine innerhalb der Zelllinie gleichmässige Expression von Akt und Erk unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Die Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473, sowie die Phosphorylierung von Erk ist deutlich bei den Zellansätzen, die nur NGF ausgesetzt waren zu erkennen. Sobald K252a zu den Ansätzen mit NGF hinzugefügt wurde, erfolgt keine Phosphorylierung der beiden Signaltransduktionsproteine. Als Kontrolle zeigen die unbehandelten Ansätze und die alleinige K252a-Zugabe bei unveränderter Ausgangsproteinmenge von Akt und Erk keine veränderte Phosphorylierungsreaktion.

5.7.4 Inhibition der Phosphorylierung von Erk durch PD098059

PD098059 inhibiert spezifisch die Aktivierung von Erk. Um die Wirkung von PD098059 auf die Signalkaskade an NGF inkubierten K562-trk Zellen zu untersuchen, wurden diese wiederum für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in serumfreien Medium aufgenommen und entweder mit 100µM PD098059 allein, 100ng/ml NGF allein oder mit 100µM PD098059 und 100ng/ml NGF für 10 Minuten inkubiert. Bei der Inkubation mit NGF und PD098059 wurden die Zellen zunächst für eine Stunde in serumfreien Medium mit PD098059 vorinkubiert und danach NGF für 10 Minuten hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Proteinylysataufbereitung und Western Blotting zum Nachweis von Erk und Phospho-Erk mit den spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden jeweils Proben ohne NGF und PD098059 verwendet.

Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen die gleichmässige Expression von Erk unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Phosphorylierung von Erk ist am deutlichsten bei den Zellansätzen zu erkennen, die nur NGF ausgesetzt waren.

Ebenso zeigt sich eine schwächere Bande bei dem Versuchsansatz ohne Zusätze und dem Versuchsansatz mit PD098059 und NGF. Lediglich der Ansatz mit alleiniger Zugabe von PD098059 weist keine Phosphorylierung von Erk auf. Die Phosphorylierung von Erk ohne Zugabe von NGF bei K562-trk könnte, eine Aktivierung des Proteins über einen anderen Signalkaskadeweg darstellen. Ein Unterbleiben der Erk-Phosphorylierung bei alleiniger PD098059-Zugabe und eine deutliche aber nicht vollständige Reduktion der Aktivierung von Erk bei Zugabe von PD098059 und NGF könnte für eine unvollständige Inhibition der Phosphorylierung von Erk durch die verwendete Konzentration von PD098059 sprechen. Die zugefügte Menge reicht aus, das ohne Zusätze aktivierte Erk vollständig zu inhibieren. Bei der NGF induzierten wesentlich stärkeren Aktivierung von Erk reicht die verwendete Konzentration von PD098059 nicht mehr dazu aus, die Phosphorylierung der gesamten Proteinmenge zu inhibieren.

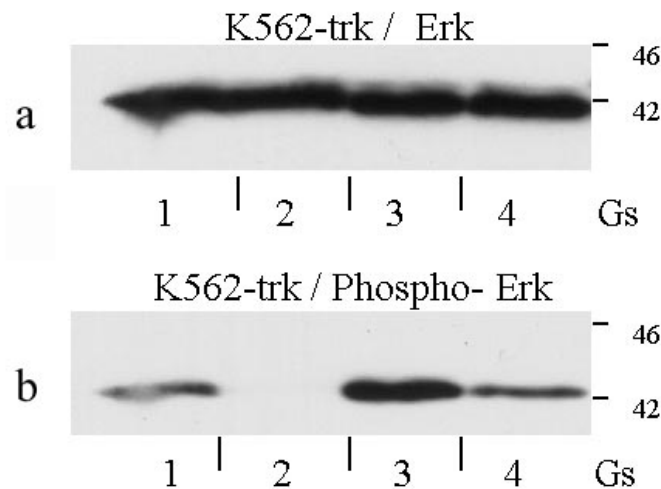


Abbildung 14

Inhibition der Phosphorylierung von Erk durch PD098059

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien K562-trk ohne Zusatz, nach Inkubation mit PD098059, nach Inkubation mit NGF und nach Inkubation mit PD098059 und NGF, je 100µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich bei gleichmässiger Protein-menge von Erk eine Inhibition der Phosphorylierung von Erk nach NGF-Inkubation durch PD098059.

a = Inkubation mit Erk Antikörpern, b = Inkubation mit Phospho-Erk Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne Zusatz, 2 = PD098059, 3 = NGF, 4 = PD098059 und NGF.

5.8 Phosphorylierung von Trk und Fos bei 32D-trk nach NGF-Inkubation

Der Signaltransduktionsweg nach Aktivierung durch NGF findet seine Fortsetzung in nachgeschalteten Transkriptionsregulatorproteinen. Das aktivierte Erk wandert aus dem Zytosol in den Zellkern und phosphoryliert dort Elk-1, das anschließend die Transkription des fos-Gens anschaltet und zum phosphorylierten Fos-Protein führt. Zum Nachweis der Veränderung der Expression des phosphorylierten Fos und der Phosphorylierung von Trk durch NGF wurden die 32D-trk Zellen zunächst für 48 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM inkubiert. Anschließend wurden sie in serumfreien Medium aufgenommen und für 5 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Proteinlysataufbereitung und Western Blotting zum Nachweis von Trk, Phospho-Trk (Tyr490) und Fos mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden jeweils die Proben ohne NGF verwendet.

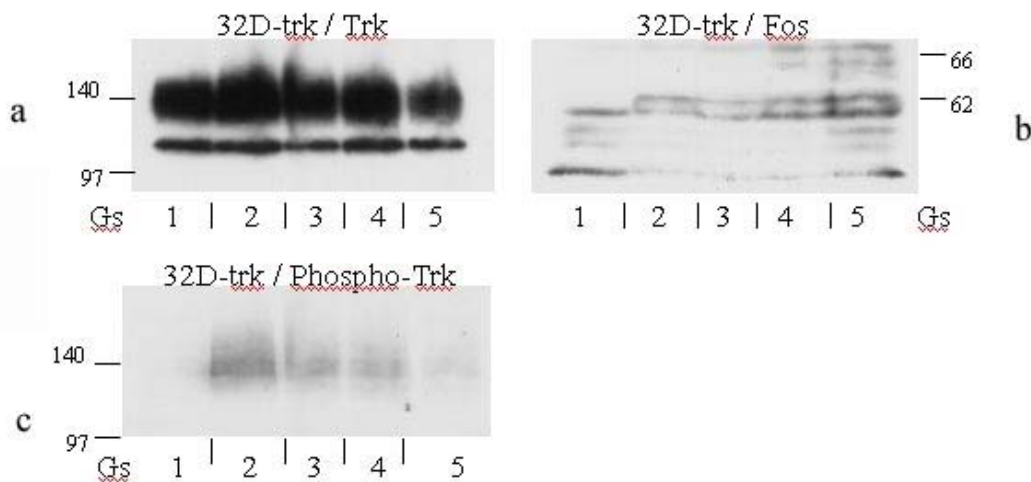


Abbildung 15

Phosphorylierung von Trk und Fos bei 32D-trk nach NGF-Inkubation

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinie 32D-trk ohne Zusatz und nach Inkubation mit NGF, je 100µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich bei gleichmässiger Proteinmenge von Trk eine Phosphorylierung von Trk nach NGF-Inkubation. Weiterhin ist nach NGF-Inkubation die zunehmende Expression des Fos-Proteins (untere Bande der Doppelbande) bei zusätzlicher Zunahme der phosphorylierten Form von Fos (obere Bande der Doppelbande) erkennbar.

a = Inkubation mit Trk Antikörpern, b = Inkubation mit Fos Antikörpern, c = Inkubation mit Phospho-Trk Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne NGF, 2 = 5 Minuten NGF, 3 = 30 Minuten NGF, 4 = 1 Stunde NGF, 5 = 2 Stunden NGF.

Die Ergebnisse in Abbildung 15 zeigen eine nahezu gleichmässige Expression des Trk-Proteins. Die Phosphorylierung von Trk am Tyrosinrest 490 ist bei den unbehandelten Zellen nicht nachweisbar, während unter NGF-Inkubation ein deutliches Signal sichtbar wird. Hierbei ist wiederum eine zeitliche Abhängigkeit der Trk-Aktivierung zu erkennen mit einem Maximum nach 5 Minuten und einer nachfolgend kontinuierlichen Abnahme der Intensität mit der Zeit. Nach NGF-Inkubation zeigt sich bezüglich der Fos-Expression eine Doppelbande. Diese ist durch das Auftreten der phosphorylierten Form von Fos zu erklären. Durch die Phosphorylierung des Proteins resultiert eine minimale Änderung der Nettoladung des Proteins und hieraus eine verringerte Wanderungsgeschwindigkeit während der Elektrophorese. Es zeigt sich eine Zunahme sowohl des nichtphosphorylierten Proteins, als auch der phosphorylierten Form mit einem Maximum nach 2 Stunden NGF-Inkubation. Dies spricht für eine vermehrte Expression von Fos und dessen Phosphorylierung nach NGF-Inkubation.

5.9 DNA-Bindung von AP-1 nach NGF-Inkubation

Neben der Phosphorylierung des Fos-Proteins über Phosphorylierung von Elk-1 kann die Map-Kinase zusätzlich das Jun-Protein phosphorylieren, welches zusammen mit dem Fos-Protein das aktiv genregulatorische Protein AP-1 bildet. AP-1 entwickelt seine Wirkung durch spezifische Bindung an DNA.

Zum Nachweis dieser spezifischen Bindung in Abhängigkeit von NGF-Substitution wurde das Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) angewendet.

Hierzu wurden zunächst 32D-trk-Zellen in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM inkubiert. Anschließend wurden sie in serumfreien Medium aufgenommen und für 20 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Hiernach wurde das Proteinlysate jeweils mit einem radioaktivem Phosphat markiertem DNA-Fragment, das die AP-1-Bindungsstelle trägt, inkubiert. Zusätzlich wurden entweder kein Kompetitor, ein AP-1 spezifischer Kompetitor oder ein unspezifischer Kompetitor hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Proben und Auftragung auf ein PAGE-Gel.

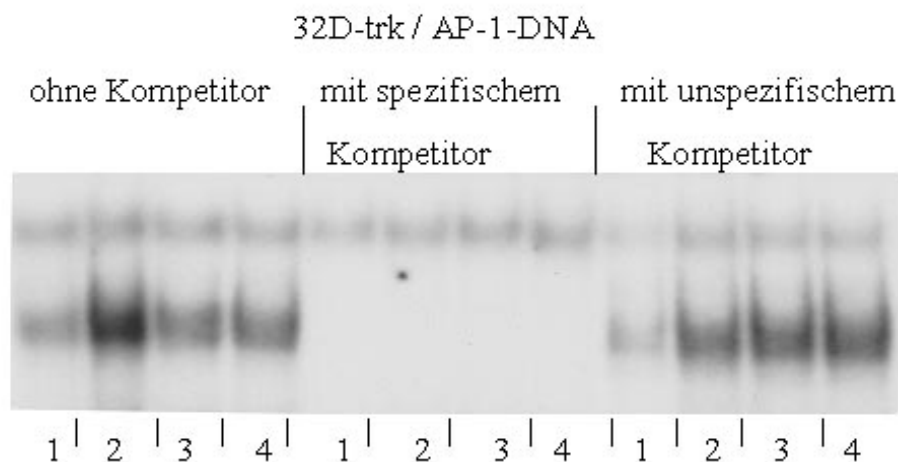


Abbildung 16

DNA-Bindung von AP-1 nach NGF-Inkubation

EMSA des Proteinlysates der Zelllinie 32D-trk nach Inkubation mit NGF ohne Kompetitor, mit spezifischem Kompetitor und mit unspezifischen Kompetitor. Es zeigt sich eine vermehrte AP-1-DNA-Bindung nach NGF-Inkubation, die nur durch einen spezifischen Kompetitor aufgehoben werden kann.

1 = ohne NGF, 2 = 30 Minuten NGF, 3 = 1 Stunde NGF, 4 = 2 Stunden NGF.

Die Ergebnisse in Abbildung 16 zeigen eine deutliche Bande des Ansatz ohne spezifischen oder mit unspezifischem AP-1 Oligonukleotidkompetitor nach Inkubation mit NGF für 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten, wobei das Signal nach 30 Minuten am stärksten ist. Erwartungsgemäss ist nach Zugabe eines AP-1 spezifischen Oligonukleotidkompetitors durch Hemmung der AP-1-DNA-Bindung kein Signal, auch nach NGF-Substitution zu erkennen. Bei Zugabe eines unspezifischen AP-1 Oligonukleotidkompetitors zeigt sich hingegen nach NGF-Zugabe ein deutliches Signal nach 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten Inkubation. Die Ansätze ohne NGF-Zugabe, sowie die Kontrollprobe zeigen jeweils ein schwaches Signal, was für eine Grundaktivierung von AP-1 ohne NGF-Inkubation spricht.

Insgesamt kann eine Zunahme der spezifische Anlagerung von AP-1 an DNA nach Inkubation der Zellen mit NGF nachgewiesen werden, wobei hiermit die gesamte induzierte Signaltransduktionskaskade bis in den genregulatorischen Bereich im Zellkern verfolgt wurde.

5.10 Wirkung von NGF auf das Zellkulturwachstum von 32D-trk und 32D-wt

Um das Wachstumsverhalten der transfizierten 32D Zellen im Unterschied zu den nicht transfizierten 32D Zellen zu untersuchen, wurden jeweils 300.000 Zellen pro Ansatz in 1ml RPMI 1640 Medium für sechs Tage inkubiert. Zusätzlich zu dem Medium wurde entweder 10% FetalcloneTM, 10% FetalcloneTM und 1ng/ml IL-3, 10% FetalcloneTM und 100ng/ml NGF, 1ng/ml IL-3 oder 100ng/ml NGF hinzugefügt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne jegliche Zusätze verwendet. NGF und IL-3 wurde am zweiten und vierten Tag mit der Hälfte der Ausgangskonzentration erneut hinzugefügt. Am zweiten, vierten und sechsten Tag wurde die Zellzahl bestimmt.

Wie die Ergebnisse in Abbildungen 17 zeigen, ist insgesamt ein deutlich stärkeres Wachstum der Zellen unter FCS-Substitution zu erkennen, sowohl bei den 32D-trk Zellen als auch bei den 32D-wt Zellen im Gegensatz zu den serumfreien Ansätzen. Interessanterweise kommt es aber bei den 32D-trk Zellen zu einer Wachstumshemmung unter NGF-Substitution trotz FCS-Gabe, die nahezu vergleichbar mit der Wachstumshemmung unter Serumentzug ist. Die Zugabe von IL-3 hat in diesen Versuchen keinen deutlichen Einfluss auf die Zellzahl-entwicklung.

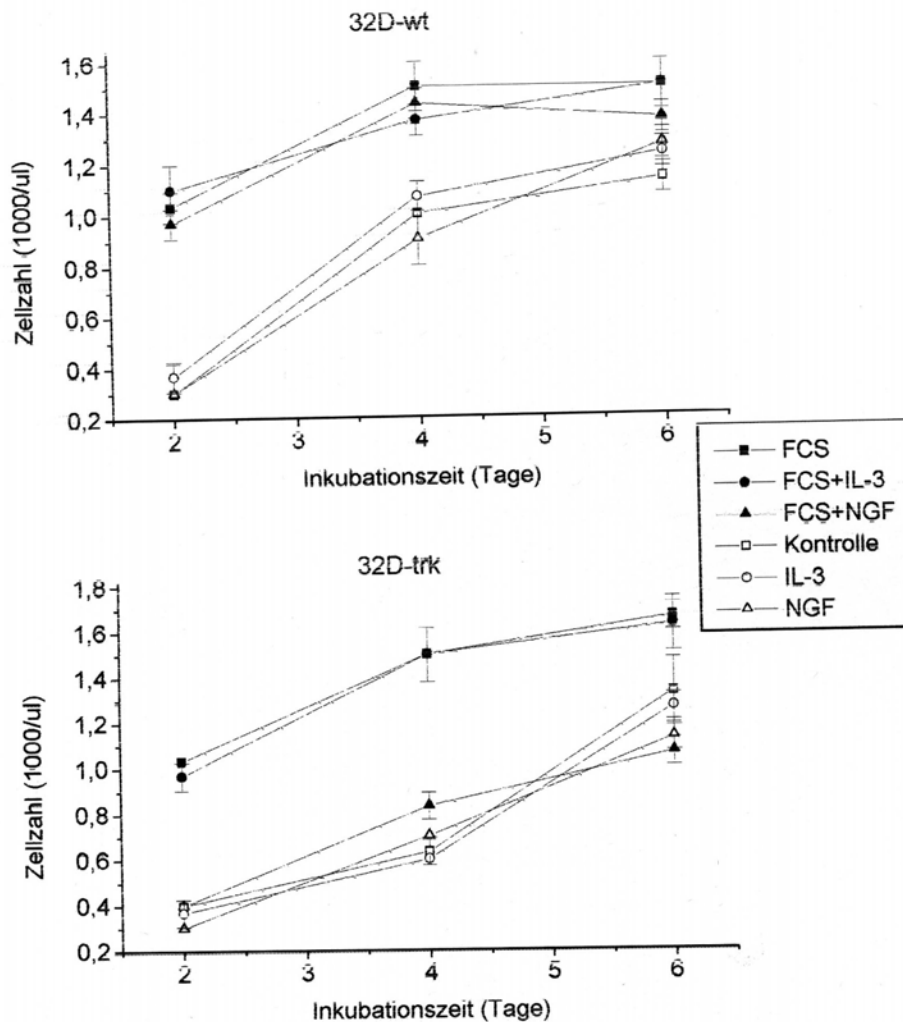


Abbildung 17

Wirkung von NGF auf das Zellkulturwachstum von 32D-trk und 32D-wt

Zellzahl in 1000/ μ l nach Inkubation von 300.000 Zellen pro Ansatz für 6 Tage mit 10% FetalcloneTM, 10% FetalcloneTM und 1ng/ml IL-3, 10% FetalcloneTM und 100ng/ml NGF, 1ng/ml IL-3, 100ng/ml NGF oder ohne jegliche Zusätze als Kontrolle. Es zeigt sich eine deutliche Supprimierung der 32D-trk Zellen nach NGF-Inkubation neben einer Supprimierung beider Zelllinien durch FCS-Entzug. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

a = 32D-wt Zellen, b = 32D-trk Zellen, FCS = fötales Kälberserum, IL-3 = Interleukin 3.

5.11 Wirkung von NGF und K252a auf das Zellkulturwachstum von 32D-trk und 32D-wt

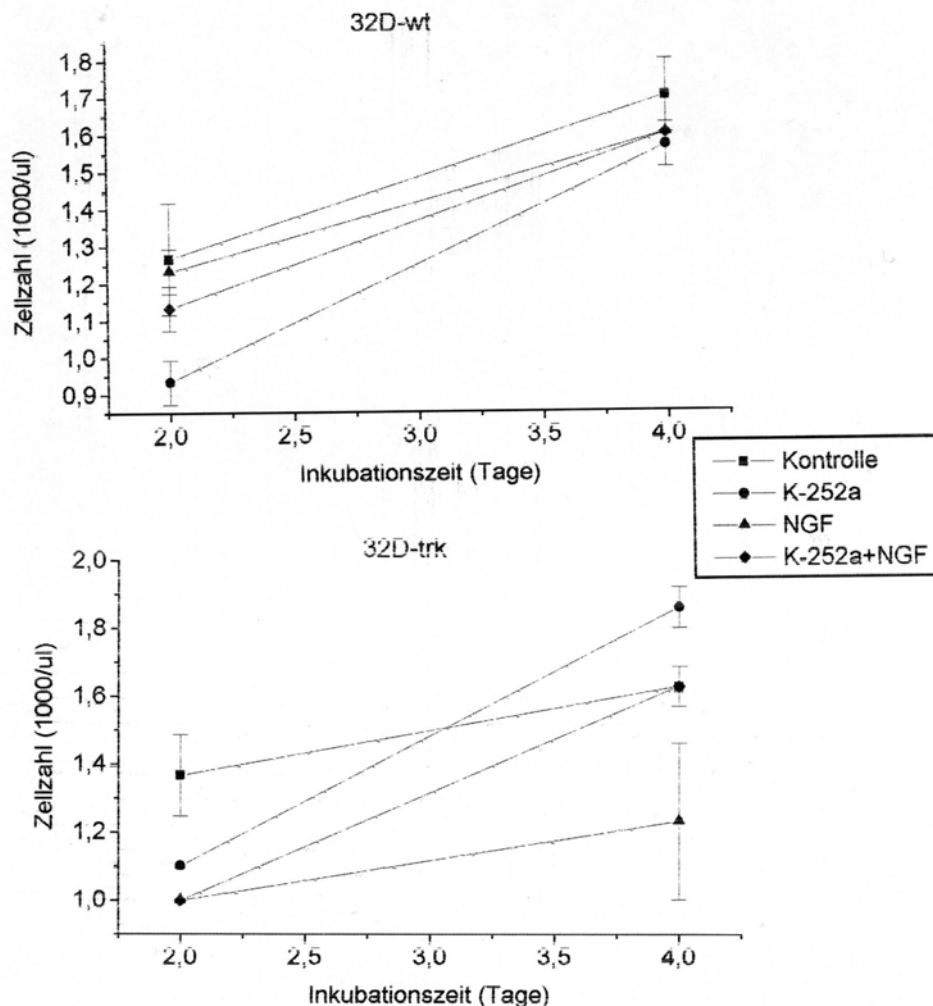


Abbildung 18

Wirkung von NGF und K252a auf das Wachstum der Zellkulturen von 32D-trk und 32D-wt

Zellzahl in 1000/ μ l nach Inkubation von 300.000 Zellen pro Ansatz für 4 Tage mit 10% FetalcloneTM als Kontrollansatz, 10% FetalcloneTM und 100nM K252a, 10% FetalcloneTM und 100ng/ml NGF, oder 10% FetalcloneTM mit 100nM K252a und 100ng/ml NGF. Es zeigt sich eine Supprimierung des Zellwachstums von 32D-trk unter NGF-Inkubation, die jedoch durch K252a aufgehoben wird. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

a = 32D-wt Zellen, b = 32D-trk Zellen.

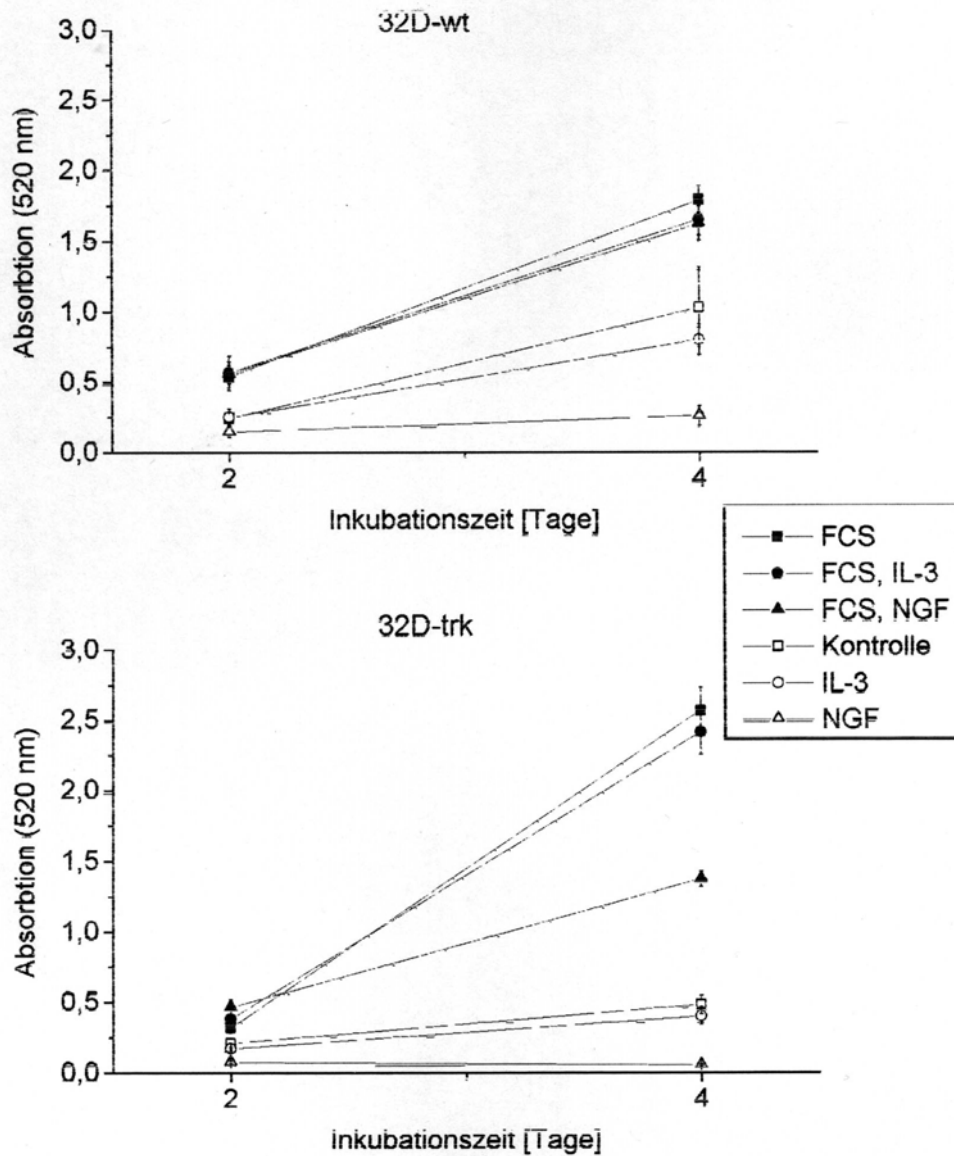
Um die Wirkung von NGF auf das Zellwachstum von 32D-trk im Unterschied zu 32D-wt näher zu untersuchen, wurde der spezifischer Trk-Kinase-Inhibitor K252a verwendet. Hierzu wurden 300.000 Zellen pro Ansatz in 1ml RPMI 1640 mit 10% FetalcloneTM und 1ng/ml IL-3 für vier Tage inkubiert. Als Zusatz wurde 100nM K252a, 100ng/ml NGF oder 100nM K252a mit 100ng/ml NGF hinzugefügt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne jegliche Zusätze verwendet. K252a wurde vor Anwendung in 100µM Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und die Zellen jeweils zunächst für eine Stunde in serumfreien Medium mit K252a vorinkubiert, bevor 10% FetalcloneTM und NGF hinzugefügt wurden. NGF, IL-3 und K252a wurden am zweiten Tag mit der Hälfte der Ausgangskonzentration erneut hinzugefügt.

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen die deutliche Supprimierung des Wachstums von 32D-trk Zellen unter alleiniger NGF-Zugabe im Vergleich zum Kontrollansatz. Diese Wirkung kann jedoch bei den 32D-trk Zellen durch Zugabe von K252a vollständig aufgehoben werden und es resultiert nach vier Tagen ein gleiches Zellwachstum wie in dem Kontrollansatz. K252a alleine scheint einen fördernden Effekt auf das Zellwachstum zu haben. Bei den gleichen Versuchsansätzen mit 32D-wt Zellen zeigt sich kein supprimierender Effekt bei alleiniger Zugabe von NGF. Ebenso wird das Wachstum der Zellen bei Zugabe von NGF und K252a nicht entscheidend beeinflusst.

Die Aufhebung der supprimierenden Wirkung von NGF in den transfizierten Zellen 32D-trk durch den Trk-spezifischen Inhibitor K252a beweist eine gezielte Wirkung von NGF über den Trk-Rezeptor bezüglich des Zellwachstums.

5.12 MTT-Test zur Beurteilung der Wirkung von NGF auf 32D-trk und 32D-wt

Mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test) kann zwischen lebenden stoffwechselaktiven und abgestorbenen Zellen durch photometrisch messbare Farbstoffanreicherung quantitativ unterschieden werden. In den zuvor durchgeführten Versuchen sah man eine Abnahme der Zellzahl unter Zugabe von NGF bei 32D-trk Zellen. Um den Anteil der vitalen und stoffwechselaktiven Zellen nach Inkubation mit NGF zu bestimmen, wurde der MTT-Test angewendet. Hierzu wurden jeweils 10.000 32D-trk und 32D-wt Zellen in 100µl RPMI 1640 Medium für vier Tage inkubiert. Zusätzlich zu dem Medium wurde entweder 10% FetalcloneTM, 10% FetalcloneTM und 1ng/ml IL-3, 10% FetalcloneTM und 100ng/ml NGF, 1ng/ml IL-3 oder nur 100ng/ml NGF hinzugefügt. NGF und IL-3 wurde am zweiten und vierten Tag mit der Hälfte der Ausgangskonzentration erneut hinzugefügt. Am zweiten und vierten und sechsten Tag wurde die photometrische Bestimmung des vitalen Zellanteils durchgeführt.



Abbildungen 19

MTT-Test zur Beurteilung der Wirkung von NGF auf 32D-trk und 32D-wt

Absorptionsrate bei 520nm nach Inkubation von 10.000 Zellen pro Ansatz für 4 Tage mit nur 10% Fetalclone™, 10% Fetalclone™ und 1ng/ml IL-3, 10% Fetalclone™ und 100ng/ml NGF, 1ng/ml IL-3, 100ng/ml NGF oder ohne jegliche Zusätze als Kontrolle. Es zeigt sich eine Abnahme der vitalen 32D-trk Zellen nach NGF-Inkubation neben einer Abnahme der vitalen Zellen beider Zelllinien unter FCS-Entzug. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

a = 32D-wt Zellen, b = 32D-trk Zellen, FCS = fötales Kälberserum, IL-3 = Interleukin 3.

Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 19, lassen erwartungsgemäss erkennen, dass bei beiden Zelllinien unter Serumgabe die Gesamtzahl der vitalen Zellen höher ist als unter Serumentzug. Bei den 32D-trk Zellen nimmt durch NGF-Zugabe die Gesamtzahl der vitalen Zellen deutlich ab, sowohl unter gleichzeitiger Serumgabe als auch unter Serumentzug. Bei den 32D-wt Zellen hat die NGF-Inkubation unter gleichzeitiger Serumgabe keinen Einfluss auf die Gesamtzahl der vitalen Zellen. Unter gleichzeitigem Serumentzug und NGF-Inkubation sinkt die Anzahl der vitalen Zellen. IL-3 zeigt in beiden Zelllinien keinen entscheidenden Einfluss auf die Menge vitaler Zellen. Zusammenfassend hat somit NGF in den 32D-trk-Zellen nicht nur einen supprimierenden Einfluss auf das Zellkulturwachstum, sondern auch auf die Gesamtmenge vitaler Zellen in der Zellkultur. Hiermit wurde die Wirkung von NGF über Trk als Rezeptor auf das Zellwachstum und die Überlebensrate der Zellen in den transfizierten 32D-trk Zellen nachgewiesen.

5.13 p27^{Kip}, p21^{Cip/Waf} und Rb bei 32D-trk und 32D-wt nach NGF-Inkubation

Zu den zentralen steuernden Reaktionen, die den Ablauf des Zellzyklus kontrollieren, gehören die Zusammenlagerung, die Aktivierung und das Auseinandergehen von Cyclin-CDK-Komplexen. Die CDK inhibierenden Proteine (*cycline dependent kinase inhibitors* = CDI), zu denen unter anderen p27^{Kip} und p21^{Cip/Waf} gehören, können durch Anlagerung an CDK-Cyclin-Komplexe diese inhibieren und somit den Ablauf des Zellzyklus beeinflussen. Weitere inhibitorische Proteine sind die Produkte von Tumorsuppressor-Genen wie zum Beispiel das Retinoblastoma-Gen-Produkt Rb. Um die hemmende Wirkung von NGF auf 32D-trk Zellen weiter zu entschlüsseln, wurden diese zellzyklusregulierenden und inhibierenden Proteine in Abhängigkeit von der NGF-Aktivierung untersucht.

Zum Nachweis der Expression von p27^{Kip}, p21^{Cip/Waf} und Rb wurden die 32D-trk Zellen und 32D-wt Zellen wiederum für 48 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM inkubiert. Anschließend wurden sie in serumfreien Medium aufgenommen und es wurden für einen Tag, zwei Tage und drei Tage NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Dann erfolgte die Proteinlysataufbereitung und Western Blotting zum Nachweis von p27^{Kip}, p21^{Cip/Waf} und Rb mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurden jeweils die Proben ohne NGF verwendet.



Abbildung 20

p27^{Kip}, p21^{Cip/Waf} und Rb bei 32D-trk und 32D-wt nach NGF-Inkubation

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien 32D-trk und 32D-wt ohne Zusatz und nach Inkubation mit NGF; je 50µg Proteinlysate pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich eine gleichmäßige Expression von p27^{Kip}, während es zu einer verstärkten Expression und Phosphorylierung von p21^{Cip/Waf} (Doppelbande) nach NGF-Inkubation in den 32D-trk Zellen kommt. Zusätzlich zeigt sich eine vermehrte Expression von Rb nach NGF-Inkubation in den 32D-trk Zellen.

a = Inkubation mit p27^{Kip} Antikörpern, b = Inkubation mit p21^{Cip/Waf} Antikörpern, c = Inkubation mit Rb Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne NGF, 2 = 1 Tag NGF, 3 = 2 Tage NGF, 4 = 3 Tage NGF.

Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen eine nahezu gleichmäßige Expression des Proteins p27^{Kip} unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in beiden Zelllinien. Das Protein p21^{Cip/Waf} ist gleichfalls in beiden Zelllinien exprimiert, jedoch deutlich stärker in der Zelllinie 32D-trk nach NGF-Substitution. Hierbei findet sich, wie zuvor bei der Expression des Fos-Proteins eine Doppelbande, die für eine zusätzliche Phosphorylierung von p21^{Cip/Waf} spricht. Ein Maximum der Expression des Proteins und seiner phosphorylierten Form findet sich hierbei nach einem Tag NGF-Substitution mit nachfolgender Abnahme der Proteinmenge in den folgenden Tagen.

Rb ist bei nicht mit NGF behandelten Zellen und bei den 32D-wt-Zellen nur schwach exprimiert, während es unter NGF-Substitution zu einer deutlichen Expression bei den 32D-trk Zellen nach einem und nach drei Tagen Inkubation kommt.

5.14 Phosphorylierung von Rb bei 32D-trk nach NGF-Inkubation

Die gemessene Expression von Rb nach NGF-Inkubation in den 32D-trk Zellen könnte eine Rolle für die wachstumsinhibierende Wirkung von NGF spielen. Jedoch ist der Phosphorylierungszustand von Rb für die zellzyklusinhibierende Wirkung des Proteins entscheidend. Im nicht phosphorylierten Zustand hemmt Rb den Zellzyklus durch Einfluss auf wachstumsinduzierende Transkriptionsfaktoren. Dieser Effekt kann durch Phosphorylierung von Rb nach Inkubation der Zellen mit Wachstumsfaktoren aufgehoben werden. Daher wurde der Phosphorylierungszustand von Rb nach Inkubation der Zellen mit NGF näher untersucht.

Zum Nachweis der unterschiedlichen Phosphorylierung von Rb an Serin und Threoninresten wurden die 32D-trk Zellen für 48 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 0,5% FetalcloneTM inkubiert. Anschließend wurden sie in serum-freien Medium aufgenommen; und es wurde für 18 Stunden und 24 Stunden NGF in einer Konzentration von 100ng/ml hinzugefügt. Die Proteinlysataufbereitung das Western Blotting erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Nachweis der Phosphorylierung des Threoninrests 373 und der Serinreste 780, 795, 807 und 811 von Rb konnte mit spezifischen Antikörpern durch Chemilumineszenz-reaktion gezeigt werden. Als Kontrolle wurden jeweils die NGF-freien Proben verwendet.

Die Ergebnisse in Abbildung 21 zeigen eine nahezu gleichmäßige Phosphorylierung von Rb an dem Threoninrest 373 und den Serinresten 780, 795, 807 und 811 in allen Versuchsansätzen bei beiden Zelllinien. NGF hat unter diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf den Phosphorylierungs- und damit Aktivitätszustand von Rb. Dieser ist über den gesamten gemessenen Zeitraum stabil. Insofern ist eine Beeinflussung des Wachstums der 32D-trk Zellen nach NGF-Inkubation trotz veränderter Expression des Proteins bei unverändertem Phosphorylierungszustand von Rb unwahrscheinlich.

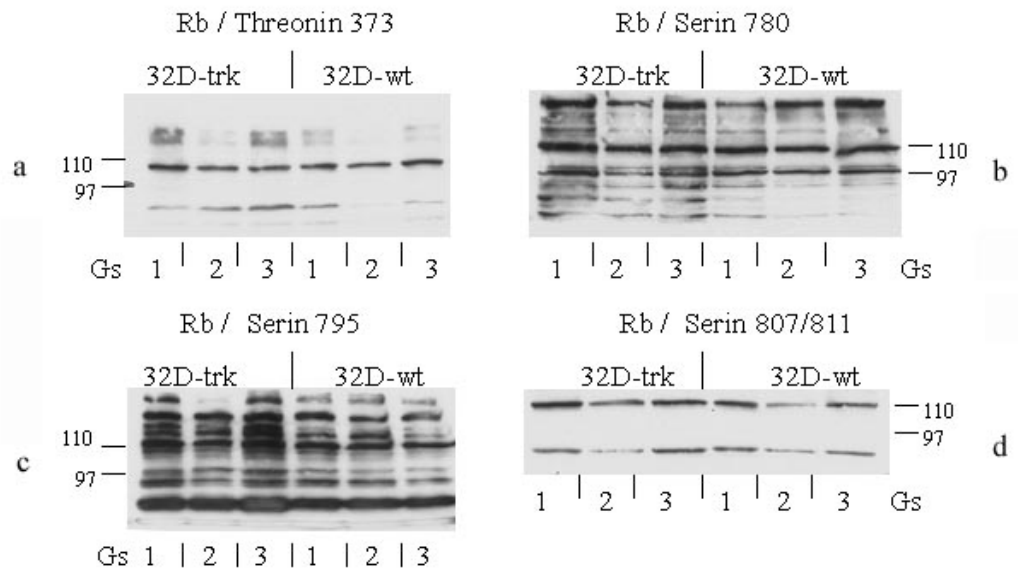


Abbildung 21

Phosphorylierung von Rb bei 32D-trk nach NGF-Inkubation

Western-Blot des Proteinlysates der Zelllinien 32D-trk und 32D-wt ohne Zusatz und nach Inkubation mit NGF, je 100µg Proteinlysat pro Ansatz aufgetragen. Es zeigt sich keine Veränderung der Phosphorylierung von Rb in beiden Zelllinien an allen untersuchten Lokalisationen nach NGF-Inkubation.

a = Inkubation mit Rb Phospho-Threonin373 Antikörpern, b = Inkubation mit Rb Phospho-Serin780 Antikörpern, c = Inkubation mit RB Phospho-Serin795 Antikörpern, d = Inkubation mit Rb Phospho-Serin807/811 Antikörpern, Gs = Gewichtsstandard in Kilodalton, 1 = ohne NGF, 2 = 18 Stunden NGF, 3 = 24 Stunden NGF.

6 Diskussion

Die Expression der Trk-Familie der Neurotrophinrezeptoren ist im Nervensystem des Menschen weit verbreitet. Zusätzlich wurde Trk auch in hämatologischen Zellen entdeckt und erstmalig von Käbisch in primären, menschlichen, myeloidischen Leukämiezellen beschrieben [53]. Die Neurotrophine wirken an ihren Rezeptoren im Nervensystem bei der Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Die Funktionen von Trk im hämatologischen System und insbesondere bei der Genese von Leukämien sind noch zu klären.

Wir versuchten dazu Trk durch Antisense-Oligonukleotide in menschlichen Leukämiezellen zu supprimieren. Die hierdurch bedingten Veränderung der Zellen hätten auf die Funktion von Trk schliessen lassen. Durch Antisense-Oligonukleotiden konnten bisher in verschiedenen Zellsystemen die Funktion einzelner Gene spezifisch gehemmt werden [80, 75]. Selten wurden auch *in vivo*-Experimente durchgeführt [92, 105, 56, 40, 106]. Jedoch wurden durch Antisense-Oligonukleotide häufig nur biologische Effekte beobachtet, ohne dass die genaue Beweisführung bezüglich spezifischer genetischer Wirkungen erfolgte [120, 110, 19].

In den gezeigten Versuchen wurde die Wirkung der Antisense-Oligonukleotide auf vier verschiedenen Ebenen untersucht: Zuerst auf die Expression von Trk als Rezeptorprotein, zweitens auf die Expression der Trk kodierende mRNA, drittens auf die Entwicklung des Zellwachstums der Zellkulturen und viertens auf die Morphologie und Differenzierung der Zellkulturen und der einzelnen Zellen. In den beschriebenen Experimenten konnten durch verschiedene Versuchsansätze zur Supprimierung von Trk mittels Antisense-Oligonukleotide keine biologischen Veränderungen hinsichtlich des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung bewirkt werden. Weiterhin zeigte sich keine messbare Verringerung des Trk Proteins und der *trk* mRNA.

Eine mögliche Ursache für die ausbleibende Wirkung der Oligonukleotide könnte, obwohl modifizierte Phosphothioat Oligonukleotide verwendet wurden, ein vermehrter Abbau derselben durch im Serum und Zytoplasma vorkommende Nukleasen sein. Auch die Aufnahme der polyanionischen Oligonukleotide durch die hydrophobe Zellmembran in die Zellen könnte erschwert sein. Wagner et al. konnten nur durch Zufügung kationischer Liposome eine Aufnahme von Oligonukleotiden erzielen [120]. Für unsere Versuche wurde daher auch Lipofectin^R zur Steigerung der Oligonukleotidaufnahme in die Zelle verwendet. Es brachte keine erkennbar veränderte Wirkung.

Weiterhin könnten sich sekundäre Strukturen in den Oligonukleotiden aufgrund ihrer Basenpaarlänge bilden oder eine Sekundärstrukturbildung in der Ziel-RNA die Anlagerung der Antisense-Oligonukleotide verhindern und ursächlich für das Fehlen der Wirkung sein. Eder wies schon nach, dass längere Oligonukleotide zwar eine höhere Wahrscheinlichkeit der spezifischen Bindung bieten, jedoch mit Zunahme der Basenpaarlänge Sekundärstrukturen bildeten [32].

In der Literatur gibt es dennoch Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von Antisense-Oligonukleotide gegen *trk*: Seriola et al. konnten zeigen, dass eine Supprimierung von NGF-Rezeptoren durch Phosphothioat-Antisense-Oligonukleotide die Entwicklung von Rattennieren in der Embryonalphase verhindert. Mittels Biotin-Streptavidin-Peroxidasefärbung konnte mikroskopisch eine Abnahme der NGF-Rezeptorexpression nach Antisense-Gabe für fünf Tage gezeigt werden, welche bei Gabe von Sense- oder Nonsense-Oligonukleotiden ausblieb. Es wurde hierbei jedoch kein Nachweis der Supprimierung auf RNA-Ebene vollzogen [103]. Und Taglialetela et al. untersuchten die Wirkung von NGF auf PC12 Zellen nach Supprimierung von *Trk* mittels Antisense-Oligonukleotiden. Hierbei konnten sie nachweisen, dass trotz fast vollständiger Supprimierung der *Trk*-Rezeptoren weiterhin eine Apoptose verhindernde Wirkung von NGF auf die Zellen bestehen blieb, für die der zusätzlich ausgebildete low affinity Rezeptor *p75* mitverantwortlich war. Die Unterdrückung von *Trk* durch 24 stündige Inkubation mit Antisense-Oligonukleotiden wurde mittels mikroskopisch dokumentierter Abnahme der immungefärbten Rezeptoren nachgewiesen [114].

6.1 Einfluß von *Trk* auf *Erk* und *Akt*

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von *Trk* im hämatologischen System wurde eine murine, myeloische Zelllinie verwendet, die durch ihre Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren ein physiologisch kontrolliertes Wachstums zeigt. Diese 32D-Zellen wurden mit *trk* transfiziert, so dass sie im Gegensatz zum ursprünglichen Wildtyp *Trk* als NGF-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Ebenso wurde die *Trk*-exprimierende Zelllinie K562 zusätzlich mit *trk* transfiziert, um die Wirkung der Überexpression von *Trk* zu beobachten. Ziel der folgenden Versuche war es, die Signaltransduktionskaskade nach *Trk*-Aktivierung durch NGF in ihren einzelnen Schritten zu verfolgen. Zunächst wurde die Veränderung der Phosphorylierung und damit der Aktivitätszustand der in der Signalkaskade vorkommenden Proteine *Erk* und *Akt* gemessen. Hierbei konnte jeweils eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der beiden Proteine bei den transfizierten Zelllinien 32D-*trk* und K562-*trk* mit einem Maximum nach 10 minütiger NGF-Inkubation gemessen werden. Zusätzlich zeigte jedoch sowohl K562-*trk* als auch K562-wt auch ohne NGF-Inkubation einen geringen Phosphorylierungsgrad von *Erk*. Dieser Phosphorylierungszustand war durch NGF-Inkubation bei K562-*trk* deutlich zu steigern. *Erk* als Schnittstelle unterschiedlicher Signalkaskadewege kann hierbei entweder durch eine andere Aktivierungsreaktion phosphoryliert worden sein, oder es kann sich bei diesem geringeren Phosphorylierungsgrad bei K562-wt und K562-*trk* um einen inaktiven Grundzustand des Proteinpools handeln. Die Aktivierung von *Akt* und *Erk* in der Signalkaskade ist in verschiedenen Zellsystemen nach Einwirkung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin, Wachstumsfaktor für Thrombozyten (*platelet-derived growth factor*=PDGF), epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*=EGF) und Fibroblastenwachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*=bFGF) nachgewiesen [12, 102].

6.2 Wirkung von Kinaseinhibitoren

Mit Hilfe einzelner Kinaseinhibitoren der Signalkaskade kann durch Aufhebung der Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalproteine eine spezifische Wirkung der inhibierten Kinasen bewiesen werden. Tapley et al. konnten einen selektiv inhibierenden Effekt des Alkaloids K252a auf die Tyrosinkinaseaktivität des Trk-Onkogenprodukts und der Neurotrophinrezeptorfamilie allgemein nachweisen [116]. In unseren Versuchen konnten wir die spezifische Wirkung von NGF mit Aktivierung von Akt und Erk über die vollständige Supprimierung der Phosphorylierung durch Zugabe von K252a beweisen.

PD098059 ist ein weiterer spezifischer Inhibitor, der die Phosphorylierung von Erk unterbindet [30]. In den hier gezeigten Versuchen wurde durch Zugabe von PD098059 in K562-trk Zellen die Phosphorylierung von Erk supprimiert. Hierbei war eine Phosphorylierung von Erk auch ohne NGF-Substitution nachweisbar. Durch Inkubation mit NGF wurde diese Phosphorylierung erneut deutlich verstärkt. Fügte man PD098059 allein hinzu konnte der ursprüngliche Phosphorylierungszustand ohne NGF vollständig aufgehoben werden, wurde jedoch PD098059 zusammen mit NGF hinzugefügt erreichte man nur eine Verminderung des ausgeprägten Phosphorylierungszustandes unter isolierter NGF-Inkubation. Die Beobachtungen sprechen für eine dosisabhängige Supprimierung der Phosphorylierung von Erk durch PD098059. Einen Effekt von PD098059 auf die durch NGF aktivierte Signalkaskade in einem anderen Zellsystem zeigten Pang et al.. Sie konnten durch PD098059 die NGF induzierte Differenzierung von PC12 Zellen über Hemmung von Erk inhibieren [87].

Das Messen der Expression und Phosphorylierung von Fos unter NGF-Inkubation ließ einen fortgeschrittenen Abschnitt der Signaltransduktionskaskade unter gleichzeitigem Einfluß auf den ersten Schritt, der Phosphorylierung von Trk beobachten. Bei dieser Versuchsanordnung konnte in den 32D-trk Zellen ein Maximum der Trk-Phosphorylierung nach 5 Minuten gesehen werden. Diese Ergebnisse entsprechen Voruntersuchungen von Kaplan und Martin-Zanca, die eine Maximum der Phosphorylierung von Trk ebenfalls nach 5 bis 10 Minuten NGF-Inkubation gemessen hatten [54, 69]. Zusätzlich fand man eine Zunahme der Fos-Expression zusammen mit der phosphorylierten Form des Proteins. Hierbei war ein Maximum der Expression nach 2 Stunden messbar. Rüdiger et al. zeigten bei ihren Untersuchungen zum Ablauf des Zellzyklus nach Gefäßverletzungen einen Anstieg von fos-RNA in einem Intervall von 30 Minuten bis 2 Stunden [97]. Fos ist als zellzyklusregulierendes Protein in Fibroblasten beschrieben worden [60]. Bei verschiedenen anderen Zelllinien wurde sowohl eine Beschleunigung des Zellzyklus nach Überexpression von Fos, als auch eine zellzyklushemmende Funktion beschrieben [68, 4]. In unseren Versuchen ist eine zellzyklusinhibierende Wirkung von Fos nach Aktivierung der Signalkaskade für die gezeigte Wachstumsverlangsamung unter NGF wahrscheinlich.

Als abschließender Schritt der Signalübermittlung von der Zelloberfläche bis in den Zellkern wurde die durch NGF induzierte Anlagerung des zusammengesetzten Proteinkomplexes AP-1 an DNA gezeigt. Dieser Prozess war innerhalb

von 30 Minuten nach NGF-Inkubation eingetreten. Die Bildung des genregulatorischen Proteins AP-1 aus Fos und Jun wird häufig im Zusammenhang mit Zellproliferation gesehen [2, 60], allerdings wurde eine Aktivierung auch bei vielen Differenzierungsprozessen zusammen mit einem Wachstumsstop beobachtet [28, 73].

Zusammenfassend wurde die durch NGF induzierte Signalkaskade vom Rezeptor der Zelloberfläche über verschiedene Signalproteine im Zytosol bis zu dem genregulatorischen Protein AP-1 im Zellkern nachgewiesen.

6.3 Einfluß von NGF auf die Proliferation

Nach der detaillierten Untersuchung des Aktivierungsweges innerhalb der Zelle blieb die Wirkung von NGF auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zelllinien von Interesse. Bei den 32D-trk-Zellen konnte die Suppression des Zellwachstums unter NGF-Inkubation gemessen werden, was im Gegensatz zu den Wildtypzellen stand. Durch den MTT-Test wurde zusätzlich belegt, dass es sich insgesamt um eine Abnahme vitaler Zellen unter diesen Versuchsbedingungen handelte. Durch Verwendung von K252a war es möglich, die zuvor gemessene Supprimierung der Zellzahl bei 32D-trk nach NGF-Inkubation wieder aufzuheben. Dieser Effekt belegt die spezifische Wirkung von NGF auch auf das Wachstum der Zellen.

Es ist bekannt, dass in PC12 und Neuroblastomzellen aktiviertes Trk das Zellwachstum inhibiert [37, 71]. In unseren Experimenten hatte NGF auf die transfizierten 32D-Zellen im Gegensatz zu den 32D-wt Zellen ebenfalls einen deutlich wachstumshemmenden Effekt. Auch Muragaki et al. beobachtete in trk transfizierten Medulloblastomazellen nach NGF-Aktivierung von Trk einen Zelltod induzierenden Effekt innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation [78].

Bei PC12 Zellen wurde die antimitotische Wirkung von NGF-aktiviertem Trk mit einem Anstieg des CDI $p21^{Cip/Waf}$ in Zusammenhang gebracht [126]. In Schwann'schen Zellen konnte Alison et al. durch Aktivierung der Raf-Signalkaskade einen $p21^{Cip/Waf}$ induzierten Zellzyklusarrest nachweisen [67]. Weiterhin wurde eine Aktivierung von $p21^{Cip/Waf}$ durch Wachstumsfaktoren in verschiedenen Leukämiezelllinien mit einhergehender Wachstumshemmung und Differenzierung beobachtet [49, 129].

Wir untersuchten weitere zellzyklusinhibierende Proteine, um die Ursache der wachstumshemmenden Wirkung von NGF in unseren Experimenten verständlich zu machen. Hierbei fand sich bei $p21^{Cip/Waf}$ eine deutliche Zunahme der Expression nach NGF-Inkubation bei den transfizierten Zellen. Diese Beobachtungen unterstützen die oben genannten Ergebnissen von Yan, Lloyd und Zhang und macht die wachstumshemmende Wirkung von NGF über $p21^{Cip/Waf}$ wahrscheinlich.

In Makrophagen zeigte sich nach Zugabe von Wachstumsfaktoren eine Abnahme von $p27^{Kip}$ bis zu über 50% nach 3 Stunden [57] und in T Lymphozyten fand sich nach IL-2 Gabe ebenfalls eine Abnahme von $p27^{Kip}$ mit nachfolgendem Eintritt der Zellen in den Zellzyklus [83]. In unseren Versuchen zeigte sich jedoch keine Veränderung der Expression von $p27^{Kip}$ unter NGF-Inkubation, sowohl bei den

32D-trk als auch bei den 32D-wt Zellen, was eine entscheidende Rolle des Proteins bezüglich der NGF-Wirkung in unseren Experimenten ausschloss.

Das Protein Rb hat wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus. Ein kompletter Verlust der Rb-Funktion führt nicht nur in Retinoblastomazellen, sondern auch in verschiedenen anderen Tumoren zum verstärkten Wachstum [122]. Eine Überexpression von Rb in Zellen ohne Rb-Expression lässt die Zellen in der ersten Phase des Zellzyklus verweilen und reduziert das neoplastische Wachstumspotential der Zellen [45]. Entscheidend für die Wirkung von Rb ist jedoch der Phosphorylierungszustand des Proteins. Dem nicht phosphorylierten Zustand von Rb wird am ehesten eine zellzyklusinhibierende Wirkung zugeschrieben [31], wobei eine genaue Klärung der unterschiedlichen Aktivitätszustände von Rb in den einzelnen Zellzyklusphasen und der damit verbundenen fördernden oder inhibierenden Wirkung auf den Zellzyklus noch aussteht.

Die Expression des Tumorsuppressors Rb war nach NGF-Inkubation in unseren Versuchen bei den transfizierten Zellen verstärkt. Der Phosphorylierungszustand von Rb an dem Threoninrest 373 und den Serinresten 780, 795, 807 und 811 blieb jedoch nach 18 Stunden und 24 Stunden Inkubation mit NGF, sowohl bei den transfizierten Zellen als auch bei den 32D-wt-Zellen unverändert. Ohne eine Veränderung der Phosphorylierung von Rb durch NGF ist eine wachstumsinhibierende Wirkung über diesen Signalweg unwahrscheinlich.

Zusammenfassend betrachtet ist die gemessene Inhibierung des Zellwachstums bei D32-trk Zellen nach NGF-Inkubation zum Einen durch die Aktivierung der Trk nachfolgenden Signalkaskade bis zur Expression und Phosphorylierung von Fos und zum Anderen durch die Aktivierung des CDI p21^{Cip/Waf} mit beiden Proteinen eigenen, wie auch mehrfach in anderen Zellsystemen nachgewiesenen wachstumshemmenden Effekten zu erklären.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Seit Jahren ist das Gebiet der Signaltransduktion von Rezeptorproteinen über eine verzweigte Kaskade von intrazellulären Proteinen bis zur Regulation der Gen-expression im Zellkern als Antwort auf extrazelluläre Wachstumsfaktoren oder Hormone von grossem Interesse. Das durch diese Mechanismen kontrollierte Zellwachstum und die Differenzierung der Zellen können durch geringe Fehler in den Signaltransduktionsketten zu unkontrolliertem Wachstum und damit zur Neoplasieentwicklung führen. Die meisten der entdeckten Onkogene sind Varianten der physiologischen Signaltransduktionsproteine, oder veränderte Wachstumsfaktoren, die Einfluss auf die maligne Entwicklung der Zellen nehmen. Die Wirkung des Wachstumsfaktors NGF über Trk als Rezeptor wurde in Nervenzellen bisher ausführlich untersucht. Die Familie der Trk-Tyrosin-kinasen hat aber nicht nur im Nervensystem, sondern auch in vielen anderen Organsystemen bei der Entwicklung und Differenzierung der Zellen als Rezeptoren der Neurotrophine Bedeutung. Innerhalb des hämatologischen Systems, insbesondere bei den Leukämien, deutet ihr Vorkommen auf eine mögliche außergewöhnliche wachstumsregulierende Rolle hin.

Um die Funktion von Trk im hämatologischen System zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit zunächst versucht, Trk durch Antisense-Oligonukleotide zu supprimieren, um von einer möglicherweise hierdurch bedingten Veränderung der Zellen auf die Funktion von Trk schliessen zu können. Es wurde die Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden auf die Expression von Trk als Rezeptorprotein, auf die trk-mRNA, auf das Zellwachstum und die Differenzierung der Zellen untersucht. Da in den durchgeführten Experimenten unter verschiedenen Versuchsbedingungen keine messbaren Veränderungen von Trk auf Protein- oder RNA-Ebene und keine biologischen Effekte in den Zelllinien HEL und K562 beobachtet werden konnten, wurde im Weiteren die Wirkung von NGF auf mit trk transfizierte 32D-trk und K562-trk Zellen im Vergleich zu ihren Wildtypen 32D-wt und K562-wt untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Abnahme des Zellwachstums unter NGF-Inkubation bei den 32D-trk Zellen beobachtet werden, welche durch spezifische Hemmung von Trk durch K252a vollständig reversibel war. Zusätzlich konnte die durch NGF über Trk induzierte Signal-kaskade mit Phosphorylierung von Erk und Akt und ihrer jeweils spezifischen Hemmung, weiterhin die Expression und Phosphorylierung von Fos und zuletzt die Anlagerung des genregulatorischen Proteins AP-1 an DNA gezeigt werden. Hiermit wurde erstmalig in diesem hämatologischen Zellsystem der Weg der Signaltransduktionskaskade vom Wachstumsfaktor NGF bis zur Genregulation dargestellt.

Die wachstumsinhibierende Wirkung von NGF in den beschriebenen Experimenten wird am ehesten durch die Aktivierung von Fos über die nachgewiesene Signaltransduktionskaskade und die zusätzliche Aktivierung des zellzyklusinhibierenden Proteins p21^{Cip/Waf} erklärt.

Durch weitere Entschlüsselung des verzweigten Systems der Signalübermittlung in den Zellen, mit Übersetzung der Information der Wachstumsfaktoren und

Hormone in spezielle Muster der Genexpression und damit spezifischen Zellreaktion, können eventuell neue Ansatzpunkte für eine gezielte Regulierung maligner Zellwachstumsformen gefunden werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Akhtar S, Kole R, Juliano RL: Stability of antisense DNA oligonucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci.* 1991; 49: 1793-1801.
2. Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* 1991; 1072: 129-157.
3. Bacus SS, Chin DM, Stem RK, Ortiz R, Ruby SG, Weinberg DS: HER-2/neu oncogene expression, DNA ploidy and proliferation index in breast cancer. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1992; 14: 433-445.
4. Balsalobre A, Jolicoeur P: Fos proteins can act as negative regulators of cell growth independently of the fos transforming pathway. *Oncogene* 1995; 11: 455-459.
5. Banks BE: Nerve growth factor: an enigma still? *Biochem. Soc. Trans.* 1984; 12: 173-176.
6. Barbacid M: The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 1994; 25: 1386-1403.
7. Barde YA: Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 1989; 2: 1525-1534.
8. Bennet CF, Crooke ST: Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *Adv. Pharmacol.* 1994; 28: 1-43.
9. Bennet CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JEE, Mirabelli CK: Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 1023-1033.
10. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang L, Nabel GJ: Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 1990; 250: 997-1000.
11. Bishop JM, Baker B, Fujita D et al.: Genesis of a virus-transforming gene. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1978: 219-223.
12. Boudewijn M, Bugering TH, Coffey PJ: Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH-kinase signal transduction. *Nature* 1995; 376: 599-602.
13. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH: An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; 249: 64-67.

14. Boyle MDP, Lawman MJP, Gee AP et al.: Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J. Immunol.* 1985; 134: 564-568.
15. Campbell SL, Khosravifar R, Rossmann KL, Geoffrey JC, Der CJ: Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-1413.
16. Campisi J, Gray HE, Pardee AB, Dean M, Sonenshein GE: Cell cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* 1984; 36: 241-247.
17. Cerutti J, Trapasso F, Battaglia C et al.: Block of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human thyroid carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Res* 1996; 2: 119-123.
18. Chao MV: The p75 Neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 1994; 25: 1373-1385.
19. Cheng YC, Gao W, Han F: Phosphothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNaseH: implications of antisense technology. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41: 223-229.
20. Chevalier S, Praloran V, Smith C et al.: Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 1994; 83: 1479-1485.
21. Chiang MY, Chan H, Zounes MA, Freier SM, Lima WF, Bennett CF: Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (18): 162-171.
22. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.
23. Coghlan DW, Fisher SG, Kirschner MW et al.: The incidence and prognostic significance of mutations in codon 13 of the N-ras gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 1682-1687.
24. Cooney M, Czernuszewicz G, Postel E, Flint SJ, Hogan ME: Site specific oligonucleotide binding repress transcription of the human c-myc gene. *Science* 1988; 241: 456-458.
25. Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing S, Nanduri V, O'Rourke LF, Barbacid M: The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 173-183.

26. Cotter FE, Johnson P, Hall P et al.: Antisense oligonucleotides suppress B-cell Lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* 1994; 9: 3049-3056.
27. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-239.
28. Dixit VM, Marks RM, Sarma V, Prochovnik EV: The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogen transcription. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 16905-16909.
29. Donner L, Fedele LA, Garon CF et al.: McDonough feline sarcoma virus: characterisation of the molecularly cloned provirus and its feline oncogene (v-fms). *J. Virol.* 1982; 41: 489-500.
30. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7686-7689.
31. Dyson N: pRb, p107 and the regulation of the E2F transcription factor. *J. Cell Sci.* 1994; 18: 81-87.
32. Eder PS, De Vine RJ, Dagle JM, Walder JA: Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res. Dev.* 1991; 1: 141-151.
33. Erhard PB, Erb P, Graumann U et al: Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10984-10988.
34. Erikson RL, Collet MS, Erikson E et al.: Evidence that the avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 6260-6264.
35. Franke TF, Kaplan DK, Cantley LC, Toker A: Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-biphosphate. *Science* 1997; 275: 665-668.
36. Galaktionov K, Jessus C, Beach D: Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev.* 1995; 9: 1046-1058.
37. Greene LA, Tischler AS: PC12 pheochromozytoma cells in neurobiological research. *Adv. Cell Neurobiol.* 1982; 3: 373-414.

38. Gudat F, Laubscher A, Otten U, Pletscher A: Shape changes induced by biologically active peptides and nerve growth factor in blood platelets of rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 1981; 74: 533-538.
39. Hamada A, Watanabe N, Ohtomo H et al.: Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Brit. J. Haematol.* 1996; 93: 299-302.
40. Hijiya N, Zhang J, Ratajczak MZ, DeRiel K, Herlyn M, Gewirtz AM: The biological and therapeutic significance of c-myc expression in human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 4499-4503.
41. Hirama T, Koeffler HP: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 86: 841-855.
42. Hoke GD, Draper K, Freier SM, Gonzalez C, Driver VB, Zounes MC, Ecker DJ: Effects of phosphothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acid Res.* 1991; 19: 5743-5748.
43. Horiike S, Misawa S, Nakai H, et al.: N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1994; 8: 1331-1336.
44. Horowitz JM: Regulation of transcription by the retinoblastoma protein. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6: 124-132.
45. Huang HJ et al.: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* 1988; 242: 1563-1566.
46. Hunter T: A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987; 50: 823-829.
47. Ihle JN: Cytokine receptor signaling. *Nature* 1995; 377: 591-594.
48. Iversen P: In vivo studies with phosphorothioate oligonucleotides: pharmacokinetics prologue. *Anti-Cancer Drug Design* 1991; 6: 531-538.
49. Jiang H, Lin J, Su Z, Collart FR, Huberman E, Fisher PB: Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21 WAF1/CIP1 expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994; 9: 3397-3399.
50. Jing S, Tapley P, Barbacid M: Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 1992; 9: 1067-1079.
51. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M: Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986; 47: 545-554.

52. Josephs SF, Guo C, Ratner L et al.: Human-proto-oncogene nucleotide sequences corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science* 1984; 223: 487-491.
53. Kabisch A, Brokt S, Seay U, Lohmeyer J, Jäger U, Pralle H: Expression of nerve growth factor c-TRK in human myeloid leukaemia cells. *Brit. J. Haematol.* 1996; 95: 102-109.
54. Kaplan DR, Marin-Zanca D, Parada LF: Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 1991; 350: 158-160.
55. Karin M, Liu Zg, Zandi E: Ap-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biology* 1997; 9: 240-248.
56. Katajima I, Shinohara T, Bilakovics J, Brown DA, Xu X, Nerenberg M: Ablation of transplanted HTLV-1 Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kappa B. 1993 *Science*; 259: 1523-1529.
57. Kato J, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CF: Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27 Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79: 487-492.
58. Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M: The trkB tyrosine kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and Neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 395-403.
59. Kole R, Shukla RR, Akhtar S: Pre-mRNA splicing as a target for antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991; 6: 271-286.
60. Kovary K, Bravo R: The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11: 4466-4472.
61. Kramer K, Gerald W, Lesauteur L, Saragovi HU, Dheung NKV: Prognostic value of TrkA protein detection by monoclonal antibody 5c3 in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 1996; 8: 1361-1367.
62. Lamballe F, Klein R, Barbacid M: TrkC, a member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for Neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 967-979.
63. Levi-Montalcini R: The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237: 1154-1162.
64. Levine AJ: The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp.* 1989; 20: 221-230.

65. Levine AJ: The tumor suppressor genes. *Ann. Rev. Biochem.* 1993; 62: 623-651.
66. Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS: Neutrophic factors: from molecule to man. *T.I.N.S.* 1994; 17: 182-190.
67. Lloyd AC, Obermüller F, Staddon S, Barth CF, McMahon M, Land H: Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev.* 1996; 11: 663-677.
68. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA: Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13: 841-846.
69. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M: A human oncogene formed by fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986; 319: 743-748.
70. Matthews JA, Baki A, Hynds C, Kricka LJ: Enhanced chemiluminescent method for the detection of DNA dot-hybridisation assays. *Anal. Biochem.* 1985; 151: 205-209.
71. Matushima H, Bogenmann E: Expression of trkA cDNA in neuroblastoma mediates differentiation in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 1993; 17: 7447-7456.
72. Meakin SO, Shooter EM: The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 323-330.
73. Melamed D, Resnitzky D, Haimov I, Levy N, Pfarr CM, Yaniv M, Kimeti A: Interleukin 6 induces DNA binding activity of AP-1 in M1 myeloblastic cells but not in growth resistant derivative. *Cell Growth Differ.* 1993; 4: 689-697.
74. Miller PS: Oligonucleotide methylphosphonates as antisense reagents. *Biotechnology* 1991; 9: 358-361.
75. Milligan JF, Matteucci MD, Martin JC: Current concepts in antisense drug design. *J. Med. Chem.* 1993; 36: 1923-1933.
76. Monia BP, Jonston JJ, Ecker DJ, Zounes MA, Lima WF, Freier SM: Selective inhibition of mutant Ha-ras mRNA expression by antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 1993; 267: 954-962.
77. Morris CM, Hao GL, Heisterkamp N, Fitzgerald PH, Grotten J: Localization of the Trk Proto-oncogen to human chromosome bands. *Oncogene* 1991; 5: 1411-1414.

78. Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express trkA receptors. *J. Neuroscience* 1997; 17: 530-542.
79. Nakawara K, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar OG, Cantor AB, Brodeur GM: Association between high levels of expression of the trk gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *New Engl. Jour. Med.* 1993; 328: 847-854.
80. Neckers L, Whitesell L: Antisense technology: biological utility and practical considerations. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: L1-L12.
81. Newbold R: Mutant ras proteins and cell transformation. *Nature* 1984 ; 310: 586-592.
82. Nielsen PE, Eghoöm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254, 1497-1500.
83. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM: Interleukin-2 mediated elimination of p21 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994: 372:570-578.
84. Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human. *Science* 1960; 132: 1497-1502.
85. Obermeier A, Lamers R, Weismüller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A: Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 22963-22966.
86. Ortigao JF, Rosch H, Selter H, et al.: Antisense effect of oligodesoxynucleotides with inverted terminal internucleotidic linkages. A minimal modification protecting against nucleolytic degradation. *Antisense Res. Dev.* 1992, 2: 129-146.
87. Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR: Inhibition of Map kinase kinase blocks the differentiation of PC12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 13585-13588.
88. Pardee AB: G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1998; 246: 603-608.

89. Pearce FL, Thompson HL: Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J. Physiol.* 1986; 372: 379-393.
90. Porter AC, Vaillancourt RR: Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 1998; 16: 1343-1352.
91. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M: Oncogenes in solid human tumors. *Nature* 1982; 300: 539-541.
92. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM et al.: In vivo treatment of human leukemia in a SCID mouse model with c-myc antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 11823-11827.
93. Rhee SG, Choi KD: Regulation of inositol phospholipid-specific isozymes. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 12393-12396.
94. Rous P: An experimental comparison of transplanted tumors and a normal tissue capable of growth. *J. Exp. Med.* 1910: 344-366.
95. Rous P: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 1911; 347-411.
96. Rous P: Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J. Am. M. Ass.* 1911; 198-203.
97. Ruediger C, Braun-Dullaeus MD, Michael J, Mann MD, Victor J, Dzau MD: Cell Cycle Progression. *Circulation* 1998; 98: 82-89.
98. Ryder K, Lau LF, Nathans D: A gene activated by growth factor is related to v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 1487-1491.
99. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 1989; Second Edition.
100. Schaffhausen B: SH2 domain structure and function. *Biochem. Biophys. Acta* 1995; 1242: 61-75.
101. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD: Expression of the neurotrophin receptor trk C is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 12867-12871.
102. Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. *F.A.S.E.B.J.* 1995; 9: 726-735.
103. Seriola H, Saarma M, Sainio K, Arumäe U, Palgi J, Vaahtokari A,

- Thesleff I, Karavanov A: Dependence of kidney morphogenesis on the expression of Nerve Growth Factor Receptor. *Science* 1991; 254: 571-573.
104. Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995; 9: 1149-1163
105. Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD: Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell proliferation in vivo. *Nature* 1992; 359: 67-70.
106. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Nicolaides NC et al.: Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by BCR-ABL antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91 (10): 4504-4508.
107. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Volove J, Ullrich A et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer and ovarian cancer. *Science* 1989, 244: 707-712.
108. Stec WJ, Grajkowski A, Kozielkiewicz M, Uznaski B: Novel route to oligo(deoxyribonucleoside phosphorothioates) stereocontrolled synthesis of chiral oligos. *Nucl. Acid Res.* 1991; 11: 5883-5888.
109. Stehelin D, Varmus HE, Bishop, JM: DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976, 260: 171-173.
110. Stein CA: Antisense oligonucleotides-promises and pitfalls. *Leukemia* 1992, 6: 967-974.
111. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA und Kaplan DR: Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- γ 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 1994; 12: 691-705.
112. Suen KL, Bustelo XR, Pawson T, Barbacid M: Molecular cloning of the mouse grb2 gene: differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13: 5500-5512.
113. Szczylik C, Skorski T, Nicolaides NC et al.: Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr-abl antisense oligonucleotides. *Science* 1991; 253: 562-565.
114. Taghialatela G, Hibbert CJ, Hutton LA, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR: Suppression of p140^{trkA} does not abolish nerve growth factor-mediated rescue of serum-free PC 12 cells. *J. Neurochem* 1996; 66: 1826-1835.

115. Tamura T, Simon E, Niemann H et al.: gp140 v-fms molecules expressed at the surface of cells transformed by the McDonough strain of feline sarcoma virus are phosphorylated in tyrosine and serine. *Mol. Cell Biol.* 1986; 6: 4745-4748.
116. Tapley P, Lamballe F, Barbacid M: K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 1992; 7: 371-381.
117. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-212.
118. Varmus HE, Weiss RA, Friis RR, Levinson W, Bishop JM: Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1972; 69: 20-24.
119. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA: Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993; 74: 205-214.
120. Wagner RW: Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994; 372: 333-335.
121. Walder RY, Walder JA: Role of RNaseH in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 5011-5015.
122. Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle arrest. *Cell* 1995; 81: 323-330.
123. Wells RD, Collier DA, Hnavey JC, Shimizu S, Wohlrab F: The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine-oligopyrimidine sequences. *F.A.S.E.B.J.* 1988; 2: 2939-2948.
124. Whitman M, Kaplan D, Roberts T, Cantley L: Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts: implication for cellular regulation. *Biochem.* 1987; 247: 165-174.
125. Wu-Pong S, Weiss TL, Hunt CA: Antisense c-myc oligonucleotide cellular uptake. *Pharmaceut. Res.* 1992; 9 (8): 1010-1017.
126. Yan GZ, Ziff EB: NGF regulates the PC12 cellcycle machinery through specific inhibition of the cdk kinases and induction of cyclin D1. *J. Neuroscience* 1995; 15: 6200-6212.
127. Zamecnik PC, Stephenson ML: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 280-284.

128. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G: Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int. J. Cancer* 1976; 15: 47-56.

129. Zhang W, Grasso L, McCham CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, Deisseroth AB, Mercer WE: p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Research* 1995, 55: 668-677.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------|--------------------|
| Name | Christiane Heineck |
| Geburtsdag | 6.07.70 |
| Geburtsort | Mainz |
| Familienstand | ledig |

Schul Ausbildung

| | |
|----------|---|
| Mai 1989 | Abitur an dem Werner-Heisenberg-Gymnasium Neuwied |
|----------|---|

Hochschulausbildung

| | |
|----------------------------|--|
| September 1989 - März 1990 | Studium der französischen Sprache an der Universität Paul Valéry Montpellier, Frankreich |
| April 1990 | Studienbeginn im Fach Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen |
| April 1992 | Ärztliche Vorprüfung |
| August 1993 | 1. Staatsexamen |
| April 1996 | 2. Staatsexamen |
| Mai 1996 - Mai 1997 | Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Gießen, Evangelischem Krankenhaus Gießen und University of South Alabama, USA |
| Mai 1997 | 3. Staatsexamen |

Berufstätigkeit

| | |
|---------------------------|--|
| Juni 1997 - November 1998 | Ärztin im Praktikum in der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Gießen |
| seit Dezember 1998 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Gießen |

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Pralle, dem Direktor der Medizinischen Klinik IV und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin danke ich für die Überlassung des Themas und die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. A. Käbisch danke ich für die Anregung zur Arbeit, für die wissenschaftliche Beratung und die stets motivierende freundschaftliche Betreuung.

Frau U. Seay danke ich für die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Mein Dank gehört allen Patienten für die bereitwillige Mitarbeit.

Meiner Familie danke ich für das anhaltende Interesse an der Vollendung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Freunden, insbesondere Daxe Schroeter, Isabel Eberhard, Claudia Schultz, Thorsten Löbber, Andreas Budan und Henning Hofmann für ihre Unterstützung durch gemeinsam verbrachte Zeit.

Meiner besonderer Dank gilt meinem Freund Ralph, der mich liebevoll unterstützt hat und dessen kritische Durchsicht des Manuskripts zum Gelingen der Arbeit beitrug.